

THÈSE

présentée

devant l'Université Claude-Bernard de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur-Ingénieur

par

Georges SALVADOR

ÉTUDES DE CERTAINES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES PROVOQUÉES PAR L'ÉCLAIREMENT D'EUGLENA GRACILIS ÉTIOLÉE ET DÉFINITIVEMENT BLANCHIE

Soutenue le 1^{er} avril 1971

devant la Commission d'Examen

M. NIGON

Président

Mme LEFORT-TRAN

M. STOEBER

M. DAILLIE

} Examineurs

G e o r g e s S A L V A D O R

ETUDE DE CERTAINES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES
PROVOQUEES PAR L'ECLAIREMENT D'*EUGLENA GRACILIS* ETIOLEE
ET DEFINITIVEMENT BLANCHIE

Section de Biologie générale et appliquée
FACULTE DES SCIENCES DE LYON



UNIVERSITE CLAUDE - BERNARD

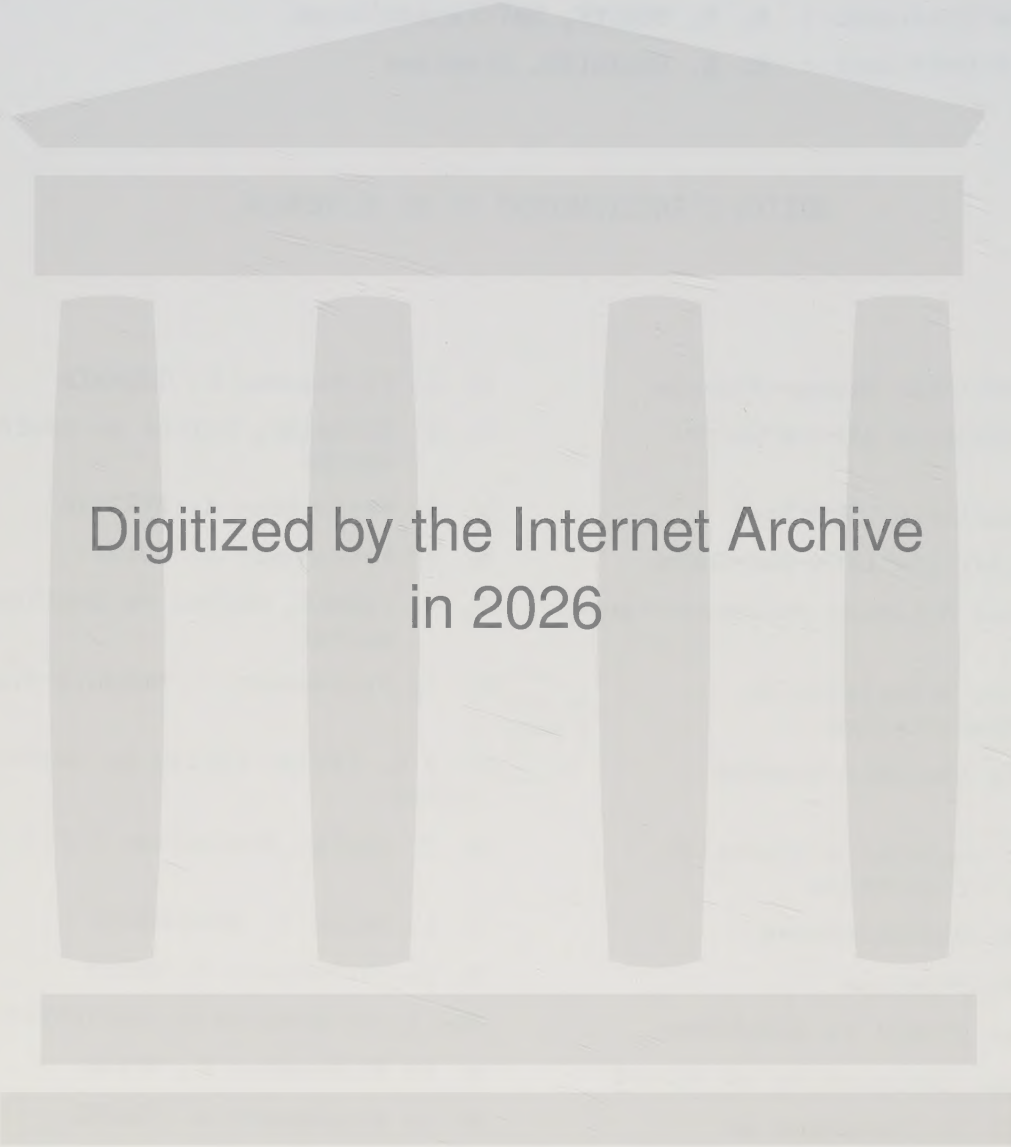
LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN
1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé
2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant
3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

U.E.R. médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. médicale LYON-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest	M. le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KÜHN
U.E.R. de Biologie humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé
Institut régional d'Education physique et sportive	M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	Mle le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M. le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire général : M. N.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0009

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur NIGON. Sa confiance et sa constante disponibilité m'ont été précieuses et m'ont facilité la tâche.

Madame le Professeur LEFORT-TRAN me fait l'honneur de participer au jury de ma thèse. Je lui suis reconnaissant de l'aide qu'elle m'a apportée dans l'interprétation des préparations de microscopie électronique.

J'adresse mes vifs remerciements à Messieurs les Professeurs STOEBER et DAILLIE qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie Monsieur JOURDAN pour l'aide qu'il m'a apportée dans la réalisation des préparations de microscopie électronique.

J'exprime ma gratitude à Madame SZAFRANEK pour le soin qu'elle a apporté dans la présentation de ce travail.

R E S U M E

Les euglènes étiolées possèdent une certaine activité de glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase (1/40 de l'activité d'euglènes vertes hétérotrophiques) et de ribulose 5 phosphate kinase (1/20 de l'activité d'euglènes vertes hétérotrophiques).

L'évolution de ces activités sous l'influence de l'éclairement comporte trois phases principales :

- doublement très rapide de l'activité, s'opérant dans les deux premières heures d'éclairement, précédé ou non d'une phase de latence d'une heure suivant les conditions de culture ;
- phase d'augmentation lente jusqu'à 6 heures ;
- phase d'augmentation rapide jusqu'au plateau qui est atteint en 2 à 4 jours suivant les conditions de culture .

Le mutant d'euglène définitivement blanchi, *al Ly 1*, possède un résidu des deux activités enzymatiques étudiées ; ce résidu est sensible à l'éclairement.

La présence d'une structure présentant la plupart des caractéristiques d'un corps prolamellaire a été mise en évidence chez l'euglène étiolée. L'existence de cette structure semble liée à un état physiologique particulier de la cellule, ce qui pourrait expliquer son absence dans les observations des autres auteurs.

L'étude ultrastructurale de la souche *al Ly 1* montre qu'elle possède un résidu de structures chloroplastiques. Quand elle est cultivée à l'obscurité, ses plastes possèdent des structures particulières non observées auparavant. L'évolution au cours de l'éclairement, après une tentative de différenciation, aboutit à une structure peu différente de la structure caractéristique de l'élevage à l'obscurité.

Plusieurs observations permettent de penser que la mutation affecterait les caroténoïdes protecteurs de la chlorophylle.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. Différenciation du système plastidien 3
- 2. Evolution des constituants enzymatiques du chloroplaste 4

MATERIEL ET METHODES

Ière PARTIE. ETUDE AU COURS DU VERDISSEMENT DES DIVERSES ACTIVITES ENZYMATIQUES LIEES AUX CHLOROPLASTES

- 1. Evolution de l'activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase au cours de l'éclairement 14
- 2. Action d'un éclairement discontinu sur l'évolution de l'activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase 16
- 3. Action de divers inhibiteurs de la protéosynthèse sur l'augmentation des activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase 17
- 4. Discussion 22

IIème PARTIE. EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DU SYSTEME PLASTIDIEN AU COURS DE L'ECLAIREMENT

- 1. Evolution morphologique de la souche Z étiolée 25
- 2. Etude de l'évolution de la souche *al Ly 1* 26
- 3. Discussion 29

CONCLUSION GENERALE

- 1. Evolution des activités enzymatiques durant la morphogenèse du chloroplaste 34
- 2. Etude morphologique des souches étiolées et *al Ly 1* 35

BIBLIOGRAPHIE

36

TABLEAUX ET FIGURES HORS TEXTE

I N T R O D U C T I O N

L'algue unicellulaire *Euglena gracilis* présente la particularité, lorsqu'elle est cultivée pendant plusieurs générations à l'obscurité, de voir réduire son système plastidien à la forme rudimentaire proplaste. Lorsque la lumière est donnée à une culture d'euglènes étiolées, les cellules reconstituent leur appareil chloroplastique en 48 heures environ. Ce processus présente, du fait de l'état unicellulaire des euglènes, une situation particulièrement favorable pour l'étude de la différenciation intracellulaire et des interactions entre les différents compartiments cellulaires au cours de cette évolution. Cette étude peut être poursuivie sur deux plans : d'une part au niveau des processus biochimiques qui se déroulent sous l'influence de l'éclairement dans les euglènes étiolées, d'autre part au niveau des structures dont l'édification constitue, à la fois, le résultat des changements biochimiques et la condition de leur développement.

Sur le plan des processus biochimiques, on distingue en particulier :

- diverses synthèses d'enzymes (SMILLIE, 1962 ; SMILLIE et col., 1963) ;
- la formation de polysomes (HEIZMANN, 1967) ;
- des synthèses d'ARN et en particulier d'ARN caractéristiques des chloroplastes (BRAWERMAN et EISENSTADT, 1964 ; HEIZMANN, 1970) ;
- la synthèse de chlorophylle ;
- la mise en place de la production photosynthétique d'oxygène (STERN et col., 1964 ; DUPUY, 1969).

NIGON et col. (1967) qualifient de photoactifs certains de ces processus très rapidement suspendus par l'arrêt de la stimulation lumineuse, comme la synthèse de la chlorophylle. Ils désignent comme photoinduits des processus qui se poursuivent durant plusieurs heures après l'arrêt de l'éclairement, comme la multiplication cellulaire déclenchée par l'éclairement (DION, 1968), ou la mobilisation des réserves et la synthèse d'ARN (FREYSSINET, 1969).

Au niveau des structures, on observe principalement la transformation des proplastides en chloroplastes fonctionnels. Cette transformation peut être étu-

diée d'une part sur des formes "sauvages" susceptibles de donner naissance à des individus complètement autotrophes, d'autre part sur des formes mutées dans lesquelles l'organogenèse plastidienne se trouve bloquée à un stade plus ou moins avancé de son évolution.

Notre étude s'est donc poursuivie parallèlement sur ces deux plans.

- Sur le plan des structures, nous avons eu la surprise de découvrir, dans la forme étiolée, un édifice qui, par de nombreux aspects, rappelle le corps prolamellaire décrit chez les Végétaux supérieurs. Des observations analogues ont été faites indépendamment par SCHIFF (1969). D'autre part, des examens parallèles pratiqués sur un mutant définitivement blanchi nous ont révélé la présence dans cette forme d'un résidu de structure plastidienne, différent selon que ce mutant est cultivé à l'obscurité ou à la lumière : ainsi ces structures résiduelles conservent une certaine sensibilité vis à vis de l'influence de la lumière.

- Sur le plan des processus biochimiques, nous nous sommes spécialement intéressés à l'évolution de certains constituants protéiques du système plastidien. En présence de la diversité des structures protéiques qui pouvaient être analysées, nous avons dû pratiquer un choix qui reste nécessairement arbitraire dans une certaine mesure. Nous nous sommes fixé l'examen de deux enzymes dont l'activité est confinée dans le chloroplaste. L'une a déjà été bien étudiée, c'est la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP ; l'autre ne l'a pratiquement jamais été, c'est la ribulose 5 phosphate kinase.

R A P P E L S B I B L I O G R A P H I Q U E S

1. DIFFERENCIATION DU SYSTEME PLASTIDIEN

Dans les cellules d'*Euglena gracilis* cultivées à l'obscurité, l'appareil chloroplastique se réduit, d'après BEN-SHAUL et col. (1964), à une trentaine de vésicules à double paroi de $1\ \mu$ de diamètre environ. Leur structure interne n'est représentée que par une ou deux membranes ; dans le stroma, on peut voir des particules ressemblant à des ribosomes. Les proplastides sont dépourvus de chlorophylle mais contiennent une faible quantité de protochlorophylle (ou de protochlorophyllide).

Au cours de l'éclairement, les proplastides se transforment en chloroplastes. A partir de deux heures d'éclairement, des invaginations du feuillet interne de la membrane plastidienne conduisent à la formation de disques. A partir de 6 heures d'éclairement, par coalescence de ces formations invaginées, se constituent des lamelles chloroplastiques. Le nombre des lamelles formées augmente comme une fonction linéaire du temps entre 14 et 72 heures, une lamelle se formant toutes les 6 heures environ. Quand le développement du chloroplaste atteint son maximum, après 13 jours d'éclairement environ, le nombre de lamelles serait de 12 à 15.

Diverses observations conduisent BEN-SHAUL et col. (1964) à penser qu'un chloroplaste se formerait par fusion de trois proplastides. Ils interprètent ainsi, en particulier, le fait que des proplastides, approximativement sphériques, ayant $1\ \mu$ de diamètre se transforment en chloroplastes de forme discoïdale plus ou moins recourbée de $6\ \mu$ de longueur sur $1\ \mu$ de largeur. L'observation des euglènes en microscopie à fluorescence les conduit à la même conclusion.

Dans les plastides des Plantes supérieures cultivées à l'obscurité, de nombreux auteurs ont décrit une structure spécifique, présentant un arrangement interne régulier, paracristallin : c'est le corps prolamellaire. Après un éclairement qui peut être très bref (10 secondes), son aspect devient moins cristallin. Si l'éclairement se prolonge, des lamelles chloroplastiques se constituent par réorganisation de la structure du corps pro-

lamellaire (LEMOINE, 1968) qui disparaît progressivement en l'espace de quelques heures. La structure définitive du chloroplaste s'édifie en 48 heures environ. Des structures analogues ont parfois été décrites sous diverses appellations, dans les organites plastidiens des cellules méristématiques (LEFORT, 1959).

2. EVOLUTION DES CONSTITUANTS ENZYMATIQUES DU CHLOROPLASTE

2.1. RAPPELS BIOCHIMIQUES

Les deux enzymes dont nous avons choisi de suivre l'évolution et qui sont la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP (D glycéraldéhyde 3 phosphate : NADP oxydoréductase n° 1.2.1.13) et la ribulose 5 phosphate kinase (ATP : D ribulose 5 phosphate 1 phosphotransférase n° 2.7.1.19) font partie du cycle de CALVIN ; c'est-à-dire qu'elles participent au cycle de fixation photosynthétique du CO₂. Bien que le CO₂ puisse aussi être fixé par carboxylation du phosphoénolpyruvate, le cycle de CALVIN est responsable d'au moins 70 % de la fixation photosynthétique du carbone (MOYSE, 1967). La figure 1 donne une représentation du cycle de CALVIN et permet de situer les réactions étudiées dans un contexte plus général.

2.2. LOCALISATION DES ENZYMES

La localisation de ces enzymes a pu être reconnue après les études de SMILLIE (1962) et de HEBER et col. (1963) sur l'isolement des chloroplastes en milieu non aqueux. En effet, dans ces conditions, la diffusion des composés hydrophiles tels que les enzymes est impossible. Les résultats de ces auteurs montrent que la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et la ribulose 5 phosphate kinase sont localisées exclusivement dans le chloroplaste.

2.3. EVOLUTION DES ENZYMES CHLOROPLASTIQUES AU COURS DE L'ECLAIREMENT

Les résultats de SMILLIE et col. (1963) et de BRAWERMAN et KONISBERG (1960) montrent que chez l'euglène, la synthèse de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase est parallèle à celle de la chlorophylle, au cours de l'éclairement. L'arrêt de l'éclairement entraîne celui de la synthèse. Il faut cependant remarquer que les premières heures du verdissement, que nous étudions surtout dans ce laboratoire, n'ont pas été étudiées par les auteurs précédents.

Chez le maïs, on observe après une latence de 6 heures, que la synthèse de la ribulose 5 phosphate kinase est parallèle à celle de la chlorophylle (CHEN et col., 1967).

2.4. ETUDE A L'AIDE D'INHIBITEURS

D'après ENNIS et LUBIN (1964), la cycloheximide inhibe spécifiquement les synthèses protéiques effectuées par les ribosomes d'organismes eucaryotiques, à situation cytoplasmique chez l'euglène. D'après GALE (1963), SPENCER (1965), ANDERSON et SMILLIE (1966), le chloramphénicol, au contraire, bloque spécifiquement les synthèses protéiques effectuées à l'aide de ribosomes d'organismes procaryotiques, à position chloroplastique chez l'euglène.

SMILLIE et col. (1967) ont montré que le chloramphénicol inhibe, chez l'euglène, la synthèse de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose diphosphate carboxylase, alors que la cycloheximide augmente plutôt leur activité. Ces auteurs en déduisent que la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase et la ribulose diphosphate carboxylase sont synthétisées à l'aide de ribosomes chloroplastiques.

Dans le cours de notre travail nous avons été amenés à reprendre ces expériences en les complétant par l'emploi des inhibiteurs suivants :

- actinomycine D qui bloque les synthèses d'ARN. Son action sur la multiplication cellulaire se faisant surtout sentir en phase exponentielle chez l'euglène (VERDIER, 1969 ; BOVARNICK et col., 1969) ;

- rifampicine qui inhibe la synthèse des ARN en se fixant sur l'ARN polymérase ADN dépendante de type procaryotique, alors qu'elle semble pratiquement sans effet sur l'ARN polymérase ADN dépendante de mammifères (WEHRLI et col., 1968 1 et 2 ; HARTMANN et col., 1967). De fait, chez l'Euglène, les synthèses d'ARN chloroplastiques provoquées par l'éclairement semblent affectées par la rifampicine alors que les synthèses d'ARN cytoplasmiques ne sont pas touchées (BROWN et col., 1970).

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

1. SOUCHE ET CONDITIONS DE CULTURE

1.1. SOUCHE

Les organismes utilisés pour ces études sont des algues unicellulaires *Euglena gracilis* souche Z. Cette souche est utilisée :

- sous sa forme étiolée, c'est-à-dire réversiblement blanchie par culture constante à l'obscurité depuis 1965 ;
- sous une forme définitivement blanchie, obtenue au laboratoire par PORTIER (1965) grâce à l'action des rayons U.V. Cette souche ne peut verdir sous l'action de la lumière et sera désignée dans la suite de ce travail : *al Ly 1* (*al* = albinos ; *Ly* = Lyon ; 1 = numéro d'ordre).

1.2. CONDITIONS D'ECLAIREMENT ET D'OBSCURITE

1.2.1. Conditions d'obscurité

Depuis 1965, les euglènes étiolées sont cultivées dans des boîtes en carton noir opaque, elles-mêmes placées dans une caisse close en bois, placée sur un support oscillant. Il s'est avéré que dans certaines conditions cet appareillage laisse tout de même filtrer un éclaircissement dont l'intensité peut atteindre 3.10^{-4} lux, suffisant pour provoquer une certaine synthèse de chlorophylle. Les cultures ayant servi à ce travail ont donc en plus été protégées par une feuille de papier d'aluminium placée autour de l'erlen. Ceci s'est démontré suffisant pour empêcher toute pénétration de lumière. Toutes les manipulations de cette souche sont faites sous un faible éclairage vert. Les propriétés inactiniques de cet éclairage ont été vérifiées en constatant l'absence de synthèse de chlorophylle sous son influence (DION, 1968).

A titre de contrôle et pour écarter l'action possible de l'éclairage vert, certaines séries de manipulations ont été effectuées à l'obscurité totale. Pour cela, l'éclairage vert a été supprimé et toute pénétration de lumière évitée au maximum. Il ne nous est bien entendu pas possible d'exclure totalement l'éventualité d'un éclairage parasite très faible qui aurait échappé à toutes nos précautions.

1.2.2. *Eclairement des cultures*

Pour les cultures servant aux observations morphologiques, la lumière est produite par une batterie de tubes fluorescents (Mazdafluor blanc super) donnant 1200 lux environ au niveau des cultures.

Les cultures servant aux mesures des activités enzymatiques sont éclairées par une lampe à vapeur de sodium donnant 4700 lux environ au niveau des cultures.

1.2.3. *Production et mesure d'éclairements de très faible intensité*

La figure 2 donne une idée du montage utilisé. La culture d'euglène est placée dans une boîte de carton noir, de dimensions 145 × 145 × 90 mm, elle-même placée dans une boîte en carton noir de 180 × 180 × 300 mm. Le couvercle de chacune de ces boîtes est percé d'une fenêtre de 75 × 75 mm sur laquelle est fixé un filtre neutre WRATTEN-KODAK d'opacité appropriée.

Ce dispositif est placé dans une pièce à 25°C sur un plateau oscillant. La pièce est éclairée par un tube fluorescent blanc donnant un éclairage de 10 lux au niveau de la paroi extérieure des boîtes précédentes.

Ce montage permet d'obtenir des éclairements jusqu'à 10^{-7} lux. On ne peut descendre en-dessous car les fuites à travers les boîtes prennent alors trop d'importance.

Une mesure de ces très faibles éclairements peut être faite en plaçant au lieu du récipient de culture, une plaque photographique vierge (GUILLEMINOT graphoguil) et en l'exposant ainsi jusqu'à une durée de 4 heures. Une plaque témoin, exposée pendant 0,25-0,5-0,75-1-1,5-2 secondes à un éclairage de 5 lux, est développée en même temps que la plaque essai et exactement dans les mêmes conditions. La mesure des densités optiques de ces plaques à 600 nm permet de calculer l'éclairement qui régnait dans la boîte.

1.3. *MILIEU ET CONDITIONS DE CULTURE ET DE JEUNE*

Les cultures sont effectuées à 25°C en erlenmeyers placés sur une table oscillante et sur le milieu mis au point par VERDIER (1969). Ce milieu permet d'obtenir de 5 à 6 millions de cellules par millilitre de culture.

Les cultures servant aux observations morphologiques sont préparées de la façon suivante. Après un jour de phase stationnaire de croissance, elles sont transportées stérilement sur la fraction minérale du milieu de culture habituel. La lumière est donnée après que les cultures aient séjourné 48 heures sur ce milieu. Les études de FREYSSINET (1969) ont montré que la vitesse du verdissement et, en particulier, celle de la synthèse de la chlorophylle,

se trouve sous la dépendance en particulier, de la quantité de paramylon présente dans la cellule au moment de l'éclairement. Celle-ci dépend elle-même de la technique de culture employée. La figure 3 donne l'évolution des quantités de paramylon et de chlorophylle dans les conditions que nous avons employées, ceci afin de faire la liaison avec d'autres expériences dans lesquelles nous n'avons pas travaillé dans les mêmes conditions.

Les cultures servant à la mesure des activités enzymatiques sont préparées d'une façon un peu différente. Parvenues en fin de phase exponentielle (4.10^6 cellules par millilitre environ), elles sont transportées stérilement sur la fraction minérale du milieu de culture (modalité A). Dans certains cas, cette fraction minérale est préparée sans chlorure d'ammonium, qui est alors ajouté à la culture au début de l'éclairement (modalité B). La lumière est donnée après que les cultures aient séjourné 7 jours sur ce milieu.

1.3. DENOMBREMENT CELLULAIRE

Le dénombrement des cellules est fait à l'aide d'un compteur électronique Coulter à partir d'une dilution de la culture dans une solution de NaCl 9 ‰.

2. DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE

La chlorophylle est extraite par agitation d'un culot d'euglènes dans 10 cc d'acétone. L'importance du culot varie de 5 à 50 millions de cellules suivant le temps d'éclairement préalable. Les cellules vidées de leurs pigments sont éliminées par filtration sur filtre en fibre de verre WHATMAN. Le filtrat est amené à une concentration en acétone de 80 % par addition d'eau distillée. La chlorophylle présente dans la solution est alors dosée par mesure de la densité optique à 663 et 645 nm et sa quantité calculée par l'emploi de la formule d'ARNON (1959).

$$\text{Chlorophylle totale en } \gamma/\text{ml} = 8,02 E_{663} + 20,21 E_{645}$$

E_{663} = densité optique à 663 nm

E_{645} = densité optique à 645 nm

Les résultats peuvent être exprimés en γ de chlorophylle par millilitre de culture ou en pg de chlorophylle par cellule.

3. DOSAGE DU PARAMYLON

La technique utilisée est celle mise au point par HEIZMANN. A une aliquote de la culture, contenant de 10 à 50 millions de cellules (conservées à -20°C si nécessaire), on ajoute deux volumes d'une solution de dodécyl-sulfate de sodium (S.D.S.) à 1 % contenant de l'E.D.T.A. à 0,5 %. On laisse la lyse des cellules s'effectuer pendant 30 minutes à 1 heure, puis on centrifuge 10 minutes à 6000 g. Le culot, composé de paramylon, est lavé deux fois à l'eau distillée bouillante puis séché à l'étuve à 80°C pendant une nuit.

Le paramylon est hydrolysé, après mise en solution dans 1 millilitre de KOH N, par 2 millilitres d'acide acétique glacial et 1 millilitre d'acide sulfurique 4 N. La solution est chauffée au bain-marie bouillant pendant 2 heures. L'hydrolysate est complété à 10 cc par de l'eau distillée.

Le glucose libéré par cette hydrolyse est dosé par réaction avec une solution d'orthotoluidine à 8 % dans l'acide acétique concentré. L'intensité de la coloration bleue obtenue est dosée à 630 nm. Ces opérations se font à l'aide d'un autoanalyseur Technicon (température du bain-marie 95°C , temps de passage de l'échantillon de 8 à 10 minutes). La densité optique lue est ramenée à une valeur en glucose par comparaison avec une courbe étalon.

Les résultats sont exprimés en pg de glucose par cellule ou en γ de glucose par millilitre de culture.

4. PREPARATION DES CELLULES POUR L'OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Après des temps d'éclairement variables, les cellules sont recueillies et rincées au cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4, par centrifugation douce à 1 000g pendant 3 minutes. Une première fixation est opérée pendant 45 minutes par une solution de glutaraldéhyde à 1 %, tamponnée par du cacodylate de sodium 0,05 M, pH 7,4. Une post-fixation est opérée durant 35 minutes par une solution de tétroxyde d'osmium 1 %, tamponnée par du cacodylate 0,075 M, pH 7,4.

Après une première inclusion dans la gélose à 2 % suivie d'une déshydratation dans les alcools 20° , 50° , 70° , 100° , l'inclusion définitive se fait dans l'epon A+B selon la technique de RICHARDSON et col., (1960).

Les coupes ultra-fines obtenues sur ultramicrotomes Reichert, montées sur grilles, contrastées selon la méthode de REYNOLDS (1963) par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, sont observées avec des microscopes électroniques Hitachi HU II A et HU II C, Philips EM 300 sous respectivement 75, 75 et 80 k.V.

5. DOSAGES ENZYMATIQUES

5.1. PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

Les échantillons de culture, dont l'importance varie de 50 à 250 millions de cellules suivant le temps de verdissement, sont centrifugés à 1000 g pendant 3 minutes de façon à recueillir les euglènes. Celles-ci sont rincées une fois avec le tampon d'extraction (tris HCl 0,05 M, pH 8), puis resuspendues dans exactement 5 millilitres du même tampon. Les cellules sont ensuite broyées à la presse de French sous une pression de 1 100 bars. Le broyat est centrifugé à 26 000g pendant 20 minutes sur une centrifugeuse Servall RC 2 B à l'aide d'un rotor HB 4. Toutes ces opérations sont effectuées en chambre froide à une température comprise entre 0 et 4°C.

L'efficacité de ce broyage a été vérifiée à deux niveaux différents :

- on vérifie que toutes les cellules sont bien broyées, par observation au microscope ;

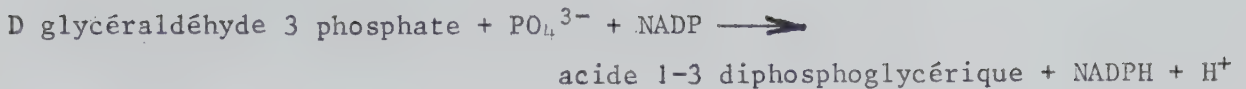
- on vérifie que la plupart des chloroplastes ont éclaté, grâce à une purification partielle de ceux-ci. Dans ce but, le broyat est déposé sur une couche de tampon amené à une densité de 1,20 à l'aide de saccharose. L'ensemble est centrifugé à 40 000g sur un rotor Spinco SW 25 pendant 25 minutes. L'interface séparant les deux couches, essentiellement composées de chloroplastes, est récupérée et sa chlorophylle est dosée. Une aliquote de la culture de départ avait été prélevée et sa chlorophylle dosée. La comparaison entre les deux dosages de chlorophylle permet de connaître le pourcentage de récupération de la chlorophylle dans l'interface. Ceci permet d'estimer le pourcentage de chloroplastes intacts. Le pourcentage de récupération de la chlorophylle ne dépassant jamais 18 %, ceci montre qu'au moins 82 % des chloroplastes sont détruits (puisque le rendement du broyage des cellules est de 100 %). L'extraction des enzymes solubles chloroplastiques est donc au moins égale et même supérieure car, en milieu aqueux, les chloroplastes qui ne sont pas détruits perdent tout de même une partie de leur contenu enzymatique.

L'extrait préparé de cette façon sert à doser les deux enzymes que nous étudions. Pour le dosage de la ribulose 5 phosphate kinase, une extraction avec un tampon 0,05 M, pH 7,5, eut été préférable, mais l'extrait enzymatique eut été inutilisable pour doser la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP. Ce procédé aurait obligé à faire deux extractions différentes ce qui était souvent impossible faute de temps.

5.2. DOSAGE DE LA GLYCERALDEHYDE 3 PHOSPHATE DESHYDROGENASE A NADP

La méthode est décrite par GIBBS M. (1955).

5.2.1. Réaction étudiée



5.2.2. Principe du dosage

Le principe de ce dosage est celui développé par WARBURG (1938) pour les deshydrogénases et est basé sur le fait que les NADPH et NADH absorbent à 340 nm alors que les NADP et NAD ne le font pas.

5.2.3. Réactifs

- tampon tris HCl, pH 8,5, 0,2 M.
- arséniate de sodium 0,17 M. L'arséniate est destiné à remplacer le phosphate inorganique dans la réaction. En effet, celle-ci est équilibrée en présence de phosphate et totale en présence d'arséniate.
- cystéine 0,04 M. La cystéine utilisée étant sous forme de chlorhydrate, elle est avant le dosage neutralisée avec de la potasse N jusqu'à un pH de 8. Elle est destinée à protéger les sites actifs de l'enzyme.
- nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) 260 $\mu\text{M}/\text{l}$.
- fluorure de sodium 0,1 M. Il est destiné à bloquer les réactions enzymatiques ultérieures utilisant l'acide diphospho 1-3 glycérique et pouvant interférer dans le dosage.
- glycéraldéhyde 3 phosphate 5 mM/l. En fait, la glycéraldéhyde 3 phosphate nous est fournie sous forme de sel de baryum du diéthylacétal. Ce produit libère la glycéraldéhyde 3 phosphate par une hydrolyse ménagée à pH 2, pendant deux jours. Le pH est ensuite ajusté à 7 à l'aide de bicarbonate de sodium.

5.2.4. Conduite de la réaction

La réaction est conduite directement dans les cuves de spectrophotomètre (passage optique = 1 cm) sous un volume total de 3 millilitres. Le mélange réactionnel contient :

- 100 μM de tampon tris
- 51 μM d'arséniate de sodium
- 12 μM de cystéine
- 60 μM de fluorure de sodium
- 0,13 μM de NADP
- 1'enzyme (de 0,1 à 0,5 unité)

L'addition de 1,5 μM de glycéraldéhyde 3 phosphate fait démarrer la réaction. L'accroissement de la densité optique à 340 nm est suivie de 30 en

30 secondes pendant 3 minutes. Les lectures sont faites contre un blanc contenant tous les réactifs sauf la glycéraldéhyde 3 phosphate remplacée par un volume équivalent d'eau distillée. Tous les réactifs sont préalablement réchauffés à 25°C qui est la température de culture des euglènes et, comme nous l'avons vérifié, la température d'activité optimale de l'extrait enzymatique.

5.3. DOSAGE DE LA RIBULOSE 5 PHOSPHATE KINASE

La méthode de dosage utilisée est celle décrite par HURWITZ (1962).

5.3.1. Réaction étudiée



5.3.2. Principe du dosage

L'ADP produit par la réaction est retransformé en ATP à partir du phosphoénolpyruvate sous l'action de la pyruvate kinase. L'acide pyruvique produit par la régénération de l'ATP est transformé en acide lactique grâce à la lactique deshydrogénase et au NADH. Une mole de NADH est convertie en NAD chaque fois qu'une mole de D ribulose 5 phosphate est phosphorylée.

Comme dans le dosage précédent, la transformation de NADH en NAD est suivie à 340 nm.

5.3.3. Réactifs

- ribulose 5 phosphate sous forme de sel disodique 0,01 M
- adénosine triphosphate (ATP) 0,1 M
- tampon phosphate bipotassique, pH 7,9 0,5 M
- cystéine 0,1 M, amenée à pH 8 à l'aide de potasse 5 N. La cystéine est comme précédemment destinée à protéger les groupements actifs de l'enzyme.
- chlorure de magnésium 0,1 M. Le magnésium est, en effet, indispensable à l'activité de toutes les kinases.
- phosphoénolpyruvate 0,01 M
- lactique deshydrogénase 5000 U/l
- pyruvate kinase 5000 U/l
- nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) 1mM

5.3.4. Conduite de la réaction

La réaction est effectuée directement dans des semi-microcuvettes de spectrophotomètre (passage optique = 1 cm) sous un volume total de 1 ml. Le mélange réactionnel contient :

- 0,5 μM de ribulose 5 phosphate
- 3 μM d'ATP
- 50 μM de K_2HPO_4
- 2 μM de cystéine
- 5 μM de MgCl_2
- 0,6 μM de phosphoénolpyruvate
- 0,3 U de lactique deshydrogénase
- 0,3 U de pyruvate kinase
- 0,06 μM de NADH
- l'enzyme (de 0,01 à 0,1 unité)

L'addition de l'enzyme fait démarrer la réaction. La diminution de la densité optique à 340 nm est suivie de 30 en 30 secondes pendant 3 minutes. Les lectures sont faites contre un blanc contenant tous les réactifs sauf le ribulose 5 phosphate remplacé par un volume équivalent d'eau distillée. Comme dans le dosage précédent, tous les réactifs sont amenés à 25°C avant la réaction.

5.4. CALCUL DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Tous les calculs sont basés sur le fait que 1 μM de NADPH (ou de NADH) a une densité optique de 6,22 à 340 nm. Comme l'unité internationale est la quantité d'enzyme qui catalyse la réaction de 1 μM de substrat par minute, nous aurons donc la formule suivante pour calculer l'activité enzymatique :

$$A = \frac{(\text{DO}_{60} - \text{DO}_{30}) \times 2 \times V_1 \times V_2}{6,22 \times N \times V_3 \times V_4}$$

- A = activité enzymatique en unités internationales par milliard de cellules
- DO_{30} = densité optique du mélange réactionnel 30 secondes après le début de la réaction
- DO_{60} = densité optique du mélange réactionnel 1 minute après le début de la réaction
- V_1 = volume réactionnel (1 pour la ribulose 5 phosphate kinase, 3 pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP)
- V_2 = volume total de l'extrait enzymatique
- V_3 = volume de l'extrait enzymatique intervenant dans la réaction
- V_4 = volume de culture d'euglène ayant servi à la préparation de l'extrait enzymatique
- N = population de la culture en milliard de cellules par millilitre

I è r e P A R T I E

ETUDES AU COURS DU VERDISSEMENT DE DIVERSES ACTIVITES
ENZYMATIQUES LIEES AUX CHLOROPLASTES1. EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA GLYCERALDEHYDE 3 PHOSPHATE DESHYDROGENASE
ET DE LA RIBULOSE 5 PHOSPHATE KINASE AU COURS DE L'ECLAIREMENT

Ces études ont été faites sur les deux souches possédées au laboratoire

- la souche Z étiolée
- la souche *al Ly 1* définitivement blanchie

1.1. ETUDE DE LA SOUCHE Z, ETIOLEE

L'évolution a été suivie sur deux catégories de culture, l'une préparée selon la modalité A de culture, l'autre préparée selon la modalité B.

1.1.1. *Eclairement d'une culture préparée selon la modalité A
(= présence de nutriment azoté durant la
phase stationnaire)*

La figure 4a donne les résultats obtenus. On voit que les activités enzymatiques évoluent de façon parallèle à la synthèse de la chlorophylle.

Chez les euglènes étiolées, l'activité des enzymes étudiées n'est pas nulle. Celle de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase est de $0,5 \pm 0,07$ unités d'enzyme par milliard de cellules, celle de la ribulose 5 phosphate kinase est de $0,2 \pm 0,06$ unité par milliard de cellules.

Un plateau d'activité est atteint vers le 4e jour, il se situe à 22 ± 2 unités enzymatiques pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase et à 9 ± 1 unités pour la ribulose 5 phosphate kinase. Le parallélisme entre l'augmentation des activités enzymatiques et la synthèse de la chlorophylle est confirmé par la figure 5. On constate qu'il est possible d'établir une relation linéaire entre les activités des enzymes et les concentrations de chlorophylle.

Cependant, lorsqu'on étudie les premières heures du verdissement, on constate qu'il n'en est pas tout à fait de même (figure 6a). L'évolution

de l'activité enzymatique dans les douze premières heures peut être divisée en trois phases pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP. Dans la première heure intervient un doublement de l'activité, puis jusqu'à 6 heures l'évolution est très lente, à peine significative d'un point de vue statistique. Après 6 heures prend place une période d'augmentation rapide ; un ralentissement intervient enfin à 96 heures.

Pour la ribulose 5 phosphate kinase, l'évolution semble quelque peu différente : un doublement d'activité intervient entre 2 h 30 et 4 heures, après le début de l'éclairement dont il est séparé par une phase d'augmentation lente. La suite de l'évolution est semblable à celle de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase.

*1.1.2. Eclairement d'une culture préparée selon la modalité B
(= absence de nutriment azoté durant la
phase stationnaire)*

L'allure de ce verdissement est donnée figure 4b. Comme précédemment on voit que les activités enzymatiques évoluent de façon parallèle à la synthèse de la chlorophylle.

Chez les euglènes étiolées l'activité des enzymes étudiées n'est pas nulle. La glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase est présente à raison de $0,7 \pm 0,07$ unités d'enzyme par milliard de cellules alors que la ribulose 5 phosphate kinase l'est à raison de $0,87 \pm 0,1$ unité par milliard de cellules.

Un plateau d'activité est atteint à 48 heures mais à 24 heures la majeure partie de l'augmentation est déjà intervenue. Ce plateau se situe à 22 ± 2 unités enzymatiques pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase et de 9 ± 1 unités pour la ribulose 5 phosphate kinase.

La figure 5 montre que, comme précédemment, les activités enzymatiques sont des fonctions linéaires de la quantité de chlorophylle.

L'étude des premières heures de l'éclairement (figure 6b) montre que la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase, après une phase de latence de 1 heure (les points 0 et 1 heure ne sont pas significativement différents), voit son activité doubler entre 1 heure et 2 heures 30. Après une période d'évolution lente de l'activité, celle-ci augmente très rapidement à partir de 6 heures pour atteindre pratiquement un plateau à 24 heures.

La ribulose 5 phosphate kinase évolue de façon analogue ; cependant le premier doublement d'activité se fait entre 1 heure et 4 heures après une phase de latence de 1 heure.

1.1.3. Comparaison entre les deux modalités de culture

Nous voyons tout d'abord que chez les euglènes cultivées à l'obscurité

rité, les activités enzymatiques étudiées ne sont pas les mêmes si la culture a disposé ou non d'azote pendant la période de jeûne :

- $0,7 \pm 0,07$ au lieu de $0,5 \pm 0,07$ pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP
- $0,87 \pm 0,1$ au lieu de $0,2 \pm 0,06$ pour la ribulose 5 phosphate kinase

Le plateau d'activité se situe quant à lui au même niveau dans les deux cas

- 22 ± 2 pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP
- 9 ± 1 pour la ribulose 5 phosphate kinase

Si l'ammonium est ajouté aux cultures, au moment de l'éclairement et non pendant la phase stationnaire ; ce plateau est atteint en deux jours au lieu de quatre.

Les mêmes phases se retrouvent, dans les deux cas, au cours des premières heures du verdissement : doublement en une heure, suivi d'une augmentation d'abord lente puis rapide jusqu'au plateau.

1.2. ETUDE DE LA SOUCHE *al Ly 1* DEFINITIVEMENT BLANCHIE

Chez le mutant *al Ly 1* définitivement blanchi, les activités enzymatiques étudiées subsistent lorsqu'il est cultivé à l'obscurité. Lorsqu'une culture de ce mutant, préparée selon la modalité B, est soumise à l'éclairement, on observe une évolution des activités enzymatiques ; en effet, après une phase de latence de 1 heure, on observe un doublement de l'activité en trois heures au plus. Ensuite, celles-ci ne subissent plus d'évolution (voir figure 7). Il faut remarquer que les taux des enzymes chez le mutant cultivé à l'obscurité sont plus faibles que chez les euglènes étiolées.

2. ACTION D'UN ECLAIREMENT DISCONTINU SUR L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA GLYCERALDEHYDE 3 PHOSPHATE DESHYDROGENASE A NADP ET DE LA RIBULOSE 5 PHOSPHATE KINASE

Des cultures préparées selon la modalité B, sont exposées à la lumière. Après des temps divers, des aliquotes de la culture sont reportées à l'obscurité.

La figure 8 montre que, quel que soit le moment de la remise à l'obscurité, l'augmentation des activités enzymatiques est immédiatement stoppée. Du moins si cette augmentation continue après l'arrêt de la stimulation lumineuse, elle est trop faible et trop brève pour être détectée. Après plusieurs heures à l'obscurité, on constate une légère diminution des activi-

tés enzymatiques, celle-ci est due, sans doute, à la multiplication cellulaire induite par la lumière qui se poursuit après retour à l'obscurité.

Les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase et de la ribulose 5 phosphate kinase semblent donc faire partie des processus photoactifs décrits par NIGON et col. (1967) au même titre que la chlorophyllogénèse (DION, 1968) et que la formation d'une famille de polysomes (HEIZMANN, 1967). L'action de la lumière sur ces activités pourrait donc s'exercer par une voie relativement directe.

3. ACTION DE DIVERS INHIBITEURS DE LA PROTEOSYNTHESE SUR L'AUGMENTATION DES ACTIVITES DE LA GLYCERALDEHYDE 3 PHOSPHATE DESHYDROGENASE A NADP ET DE LA RIBULOSE 5 PHOSPHATE KINASE

Les inhibiteurs ont été employés selon trois modalités différentes.

- A des cultures préparées selon la modalité B, les inhibiteurs sont ajoutés 16 heures avant le début de l'éclairement, ce qui semble être une des meilleures conditions d'emploi pour l'étude de leur action globale sur le verdissement (VERDIER, 1969).

- Addition des inhibiteurs 6 heures après le début du verdissement de cultures préparées selon la modalité B.

- Sur des cultures en phase exponentielle de croissance, les inhibiteurs sont ajoutés 16 heures avant le début de l'éclairement.

On a utilisé les concentrations suivantes :

- cycloheximide 15 µg/ml
- chloramphénicol 1 mg/ml
- actinomycine D de 10 à 50 µg/ml
- rifampicine de 20 à 200 µg/ml en présence de diméthylsulfoxyde à 1 %

3.1. INFLUENCE DES INHIBITEURS ADDITIONNES AVANT LE DEBUT DE L'ECLAIREMENT

3.1.1. Action de la cycloheximide

Si 16 heures avant le début de l'éclairement d'une culture préparée selon la modalité B, de la cycloheximide est ajoutée, on constate, lorsque la lumière est donnée, que la culture ne verdit pas. La synthèse de la chlorophylle dans ces conditions a été étudiée par PASCAL (1968). Nous nous bornons à rappeler qu'après une période d'activation de cette synthèse, d'environ 45 minutes, celle-ci est totalement stoppée après 90 minutes.

Compte tenu des intervalles de confiance, l'action de la cycloheximide sur les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP

et de la ribulose 5 phosphate kinase, n'est pas décelable jusqu'à 6 heures. Les premiers doublements d'activité se produisent comme dans les cultures témoins. Après 6 heures, les activités n'augmentent plus, l'inhibition étant totale à partir de ce moment (voir Tableau I).

Au troisième jour, les activités sont de :

- $1,6 \pm 0,5$ au lieu de $20 \pm 0,2$ chez les témoins pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP
- $2 \pm 0,5$ au lieu de 9 ± 1 chez les témoins pour la ribulose 5 phosphate kinase

Chez les euglènes définitivement blanchies, la cycloheximide ne semble exercer aucune action sur les faibles évolutions d'activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase (voir tableau I bis).

3.1.2. Action du chloramphénicol

L'action du chloramphénicol sur la synthèse de la chlorophylle a été étudiée par PASCAL (1968). Elle se traduit par une inhibition constante, d'environ 40 %, tout au long de l'éclairement. Nous avons obtenu un résultat similaire (voir tableau II).

Le tableau II montre que l'action du chloramphénicol sur les activités enzymatiques semble nulle. A aucun moment on ne remarque une différence significative avec les valeurs de la culture témoin.

3.1.3. Action de l'actinomycine D

Le tableau III montre que l'action de l'actinomycine D se fait seulement sentir sur la multiplication cellulaire photoinduite, et la synthèse de la chlorophylle. Les activités enzymatiques ne semblent pas touchées. On constate pourtant, à 48 heures d'éclairement, des activités légèrement plus élevées pour les cultures ayant reçu 50 γ d'actinomycine D.

3.1.4. Action de la rifampicine

La rifampicine est toujours employée en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1 %. Utilisée seule, elle n'a jamais d'effet sur les euglènes, semble-t-il par manque de pénétration de l'inhibiteur dans la cellule. Le DMSO est donc employé pour augmenter la perméabilité cellulaire (BROWN et col. 1970).

Le tableau IV montre que l'action de la rifampicine se traduit à 24 heures par des activités légèrement plus élevées que la normale. A 72 heures, par contre, on peut noter une inhibition qui va jusqu'à 15 % pour la ribulose 5 phosphate kinase avec la dose de 200 $\mu\text{g/ml}$.

La quantité cellulaire de chlorophylle est réduite surtout avec la dose de 200 µg/ml, l'inhibition atteint 40 % à 72 heures.

3.2. ACTION DES INHIBITEURS AJOUTES AU COURS DU VERDISSEMENT

3.2.1. Action de la cycloheximide

Si la cycloheximide est ajoutée 6 heures après le début de l'éclairage, la culture verdit très lentement. Les taux cellulaires de chlorophylle et d'enzymes restent largement inférieurs à ceux de la culture témoin, comme le montre le tableau V.

A 96 heures, les inhibitions sont alors de :

- 50 % pour la chlorophylle
- 75 % pour la ribulose 5 phosphate kinase
- 80 % pour la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP

3.2.2. Action du chloramphénicol

Si le chloramphénicol est ajouté 6 heures après le début de l'éclairage, son action, comme le montre le tableau VI, est pratiquement nulle, même sur la synthèse de la chlorophylle.

3.3. ACTION DES INHIBITEURS AJOUTES AU COURS D'UN VERDISSEMENT EFFECTUE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE

3.3.1. Action du chloramphénicol

Le tableau VII montre un net effet sur la multiplication cellulaire qui est très ralentie pendant 24 heures. Elle atteint cependant le même plateau à peu près en même temps que la culture témoin. Son action sur les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et la ribulose 5 phosphate kinase ne semble pas significative.

3.3.2. Action de l'actinomycine

Un effet très net de ralentissement de la multiplication cellulaire est noté (voir tableau VIII), qui se traduit par une inhibition de 40 % à 72 heures. Cependant, la croissance n'est pas arrêtée. Les taux cellulaires d'enzymes et de chlorophylle montrent des valeurs légèrement supérieures à ceux des témoins, aux temps 24 et 72 heures.

3.3.3. Action de la rifampicine

La rifampicine ne montre aucun effet notable quand elle est employée dans ces conditions (voir tableau IX).

3.4. DISCUSSION SUR LES MODALITES D'EMPLOI DES INHIBITEURS

Les principaux résultats obtenus par l'emploi des inhibiteurs chez l'euglène sont résumés dans le tableau X.

Dans la plupart des cas, bien que les résultats numériques ne soient pas tout à fait identiques, les conclusions auxquelles ils conduisent ne sont pas fondamentalement différentes. Les divergences les plus importantes concernent l'inhibition par l'actinomycine de la multiplication cellulaire en phase exponentielle.

Par contre, il y a une contradiction absolue entre nos résultats et ceux de SMILLIE et col. (1967) concernant l'inhibition de la synthèse de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP.

La plupart des différences, de caractère quantitatif, devraient pouvoir s'expliquer par :

- les modalités d'éclairement. La majorité des auteurs emploient des éclairagements identiques : environ 1500 lux en lumière blanche. BOVARNICK et col. (1969) utilisent une lumière rouge donnant 1500 lux, de façon à éviter la photodestruction de l'actinomycine. VERDIER (1969), PASCAL (1968) et nous-mêmes employons une lumière jaune (lampe à vapeur de sodium) donnant 4500 lux.
- la constitution des milieux de culture. Trois milieux sont principalement utilisés :

- le milieu décrit par GREENBLATT et col. (1959), dont le substrat carboné est constitué par du malate et du glutamate, est utilisé par POGO et col. (1964), SMILLIE et col. (1967) BOVARNICK et col. (1969) ;

- le milieu dérivé de HUTNER et col. (1951), dont la source de carbone est du butyrate de sodium, est utilisé par VERDIER (1969).

- le milieu mis au point par VERDIER (1969), dont la composition diffère du précédent, d'une part par des concentrations de butyrate et de vitamines six fois supérieures et d'autre part par des concentrations de phosphate et d'ammonium deux fois supérieures, est utilisé par PASCAL (1968) et nous-mêmes.

Il semble bien que la composition du milieu influence la pénétration des inhibiteurs.

- les modalités d'utilisation des inhibiteurs. La plupart des auteurs, sauf SMILLIE et col. (1967) transfèrent les euglènes en début de phase stationnaire sur un milieu ne permettant pas la multiplication cellulaire. Après plusieurs jours, l'inhibiteur est ajouté. La lumière n'est donnée qu'après une préincubation de l'inhibiteur de 12 à 16 heures. SMILLIE et col. (1967) transfèrent les euglènes en phase exponentielle, sur un milieu frais ne comportant pas d'autre source carbonée que les vitamines B₁ et B₁₂. Après deux jours sur ce milieu, ils ajoutent 22,5 g/l de glucose et les inhibiteurs ; la lumière est immédiatement donnée. Il se produit alors une multiplication cellulaire importante.

Les expériences de SMILLIE et col. (1967) diffèrent donc des nôtres :

- par les modalités d'éclairement
- par la composition du milieu de culture
- par les modalités d'utilisation des inhibiteurs

3.4.1. *Influence de l'actinomycine D*

Quelles que soient les conditions d'emploi de cet inhibiteur, son action sur les variations des activités enzymatiques est nulle dans nos expériences. En phase exponentielle de croissance, des doses massives d'actinomycine D ne stoppent pas complètement la multiplication cellulaire. Cette observation diffère notablement des résultats obtenus jusqu'à ce jour (voir tableau X). Pourtant, le fait que l'actinomycine D ait une action, tant en phase exponentielle qu'en phase stationnaire, sur la multiplication cellulaire et la synthèse de chlorophylle, prouve qu'elle pénètre dans les cellules. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer son action limitée :

- nos conditions de milieu, différentes de celles des autres auteurs, sont telles que les euglènes sont dans une certaine mesure imperméables à cet inhibiteur ;
- l'actinomycine D est en partie détruite par l'éclairage jaune utilisé dans nos expériences, ou inactivé par les euglènes elles-mêmes.

3.4.2. *Influence de la rifampicine*

Les résultats concernant la rifampicine n'ont pas été donnés dans le tableau X car BROWN et col. (1969) et nous-mêmes ne constatons aucune action sur la synthèse de chlorophylle et la multiplication cellulaire, quand elle est employée à la dose de 20 γ /ml.

Elle ne semble avoir une action qu'à une dose dix fois supérieure, et seulement après 24 heures d'éclairement. A cette concentration, une solution de rifampicine est fortement colorée en rouge. Sa densité optique est de 0,66 soit une transmission de 22 % à 590 nm, longueur d'onde principale de la lumière utilisée pour nos verdissement. Compte tenu du volume de la culture, une cellule ne doit recevoir qu'environ la moitié de la lumière reçue sans rifampicine. Les résultats de DION (1968) permettent cependant de penser que cette diminution de l'éclairement est insuffisante pour expliquer les résultats observés.

Il faut aussi remarquer qu'à cette concentration, la rifampicine a un effet toxique certain. La population de la culture diminue de 15 % en 72 heures. Dans ces conditions, il est bien difficile de départager l'effet toxique de l'effet inhibiteur.

Si la rifampicine provoque vraiment une inhibition, cela signifie qu'à partir de 24 heures, de l'ARN transcrit à partir de l'ADN chloroplastique, est nécessaire pour la synthèse de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase. On pourrait en conclure qu'à partir de 24 heures le chloroplaste prend une certaine indépendance vis à vis du reste de la cellule.

4. DISCUSSION

4.1. *ROLE EVENTUEL DES ENZYMES CHLOROPLASTIQUES CHEZ LES EUGLENES ETIOLEES*

Même chez les euglènes étiolées, les enzymes de la fixation du carbone sont présentes. On doit donc se demander ce que signifie le résidu enzymatique d'une voie dont l'utilité principale est la fixation et l'assimilation du CO_2 . La figure 1 montre qu'en fait le cycle de CALVIN est en grande partie identique à la voie des pentoses phosphates.

Le plus souvent une faible partie du glucose 6 phosphate est métabolisée par ce processus. Chez certains microorganismes cette voie catabolique peut devenir plus importante que la glycolyse. Le shunt des pentoses phosphates contribue à la formation des pentoses (en particulier du ribose 5 phosphate) à partir desquels sont synthétisés les ribonucléotides et les ARN. Cette contribution est très importante chez *Escherichia coli* par exemple. L'érythrose phosphate est utilisée pour la synthèse des noyaux aromatiques et indol. La voie des pentoses phosphates fonctionne aussi couplée à des voies synthétiques (acides gras, stérols) auxquelles elle fournit le NADPH qui leur est nécessaire.

On peut donc penser que l'activité mesurée chez les euglènes étiolées est la fraction de la voie des pentoses phosphates ne servant pas à la fixation du CO_2 . Ce serait une contribution du proplaste au métabolisme des glucides.

4.2. *INFLUENCE DES CONDITIONS NUTRITIONNELLES SUR LA FORMATION DE LA GLYCERALDEHYDE 3 PHOSPHATE DESHYDROGENASE ET DE LA RIBULOSE 5 PHOSPHATE KINASE*

La présence ou l'absence de nutriment azoté au cours de la phase de jeûne, entraîne des différences sensibles dans l'évolution de ces activités enzymatiques. L'absence d'azote se traduit par une phase de latence de 1 heure au début de l'éclairement. La présence d'azote conduit à une évolution beaucoup plus lente.

On pouvait penser que le manque d'ammonium au cours de la phase de

jeûne bloque certains processus. Lors de l'addition d'azote, au moment de l'éclairement, la mise en route de ces processus ne serait pas instantanée et entraînerait la latence d'une heure. Ceci a été infirmé en ajoutant l'ammonium 24 heures avant l'éclairement. Dans ces conditions, l'évolution est identique à celle de cultures n'ayant pas disposé d'azote. Il faut alors remarquer que les cellules n'ayant pas disposé d'ammonium au cours du jeûne possèdent beaucoup plus de paramylon (280 ± 20 pg par cellule) que les autres (170 ± 20 pg par cellule).

FREYSSINET (1969) a montré que la vitesse de verdissement dépendait de la vitesse d'utilisation du paramylon, elle-même fonction de la concentration de paramylon présente au début du verdissement, et de la quantité d'azote disponible. Les cultures préparées selon la modalité B possèdent plus de paramylon que les autres et plus d'azote puisqu'elles n'ont pu l'utiliser pendant la phase de jeûne. Ceci explique que les plateaux d'activité enzymatique soient, dans ce cas, atteints en deux jours au lieu de quatre.

La synthèse ou l'activation des enzymes nécessite une certaine quantité d'énergie. Cette énergie serait produite pendant la phase de latence par la dégradation du paramylon déclenchée par la lumière.

4.3. MECANISMES DE L'AUGMENTATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

En présence d'une augmentation d'activité enzymatique, deux catégories d'hypothèses que l'on cherche à départager par l'emploi d'inhibiteurs appropriés, doivent constamment être considérées.

- Cette augmentation peut résulter d'une synthèse de molécules enzymatiques nouvelles.

- Cette augmentation peut correspondre à une activation sans synthèse d'enzymes. Ainsi, MULLER et col. (1969) constatent que l'activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP peut être exaltée de cinq à six fois par l'addition de NADP.

Quelles que soient les conditions d'emploi, l'augmentation des activités enzymatiques est fortement inhibée par la cycloheximide ; elle ne l'est jamais par l'emploi du chloramphénicol. Si nous admettons les données classiques relatives au site d'action de ces inhibiteurs, on en conclut que la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et la ribulose 5 phosphate kinase sont synthétisées sur les ribosomes cytoplasmiques. C'est également l'avis de BOVARNICK et col. (1970) tandis que SMILLIE et col. (1967) parviennent à une conclusion opposée. GOODENOUGH et LEVINE (1970) trouvent un résultat identique au nôtre par une méthode différente. Lorsque le mutant *ac 20* de *Chlamydomonas reinhardtii* est cultivé sur milieu contenant de l'acé-

tate les cellules se divisent activement et le taux de ribosomes chloroplastiques est réduit de 90 %. Dans ces conditions, les seuls constituants chloroplastiques affectés sont la ribulose diphosphate carboxylase et le cytochrome 559. La ribulose 5 phosphate kinase et la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP ne le sont pas. Ils en concluent donc que ces deux enzymes sont synthétisées sur les ribosomes cytoplasmiques.

Il paraît donc évident que les augmentations d'activité enzymatique observées comportent des synthèses protéiques et peuvent être bloquées par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques. On peut se demander pourtant si une part de l'accroissement ne répond pas à des processus d'activation. Cette éventualité paraît fort vraisemblable au regard des observations suivantes :

- une partie de l'accroissement se produit même en présence de cycloheximide, chez les euglènes étiolées portées à la lumière ;

- l'absence d'action de la cycloheximide sur les augmentations d'activité des enzymes de la souche *al Ly 1* montre que, dans cette souche, il ne doit pas y avoir synthèse de nouvelles molécules protéiques.

2 è m e P A R T I E

EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DU SYSTEME PLASTIDIEN AU COURS DE L'ECLAIREMENT

I - EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DE LA SOUCHE Z ETIOLEE

1.1. STRUCTURE DES PROPLASTES

Ils ont une forme généralement sphérique d'un diamètre proche de 1μ . Ils peuvent prendre une forme allongée, parfois sous la pression de grains de paramylon voisins. Les proplastes sont limités par une double membrane. Leur stroma présente une apparence granuleuse sans doute due à la présence de ribosomes. Noyés dans le stroma, on observe :

- une ou deux structures d'aspect plus condensé, de forme irrégulièrement sphérique, que nous interprétons comme des corps prolamellaires ;
- des globules osmiophiles, de nature probablement lipidique, éventuellement situées à l'intérieur du corps prolamellaire ;
- parfois quelques lamelles courtes, accolées à la double membrane ou, plus rarement, insérées sur le corps prolamellaire ;
- dans certains cas, des lamelles disposées en cercle, qui représentent peut-être, l'aspect en section d'une invagination pariétale (voir figure 9a).

Le corps prolamellaire ne présente pas la structure paracristalline souvent décrite chez les Plantes supérieures. Son aspect est, au contraire, très proche de celui décrit pour un corps prolamellaire de Maïs après 10 secondes d'éclairement (KLEIN et col., 1964). Dans les cas les plus favorables, on distingue sur les coupes des cercles d'un diamètre voisin de $100 \text{ \AA}$ séparés les uns des autres par des distances comprises entre 50 et $150 \text{ \AA}$.

Lorsque les euglènes sont prélevées durant la phase exponentielle de croissance, la structure interne du corps prolamellaire présente des structures d'apparence tubulaire en disposition nettement plus lâche que celle observée sur les euglènes en phase stationnaire. On peut admettre que ces divers aspects correspondent à la section de structures plus complexes, telles que celles décrites par BRONCHART (1970) ou par GUNNINGS (1965), plus ou moins serrées, selon l'état physiologique des cellules.

1.2. EVOLUTION DU SYSTEME PLASTIDIEN

1.2.1. Influence des éclairagements de durée inférieure à 3 heures

Après une heure d'éclairement, le nombre de lamelles commence à augmenter. Certaines d'entre elles rayonnent à partir du corps prolamellaire, formant souvent des groupes de lamelles accolées (figure 9c). En même temps, le feuillet interne de la membrane plastidienne donne naissance à des expansions qui s'accolent pour constituer des lamelles, parfois même des empilements de lamelles, en continuité avec la membrane plastidienne.

L'évolution du plaste conduit à une disparition graduelle du corps prolamellaire ; celui-ci se désagrège par sa périphérie tandis que son centre conserve plus longtemps un aspect compact.

Dès 30 minutes, autour des lamelles d'une certaine région du plaste, on voit parfois se disposer des agrégats de protéines basiques formant des amas denses. Ceci paraît représenter une des premières étapes de la formation des pyrénoides. On explique ainsi la formation de celui-ci par le fait que ces lamelles, entourées de protéines, ne peuvent s'accoler avec d'autres pour former des empilements (LEFORT, 1962).

1.2.2. Influence des éclairagements de durée supérieure à 3 heures

Après 3 heures d'éclairement, il peut encore subsister des corps prolamellaires (figure 9e). Les jeunes plastes tendent à prendre une forme oblongue. Leurs lamelles sont disposées à peu près parallèlement à leur grand axe (figure 9d). Elles sont en général assez courtes et vont rarement d'un bout à l'autre du plaste. La longueur de celui-ci est d'environ 3 μ .

Après 8 heures d'éclairement, le plaste a pratiquement la forme du chloroplaste définitif. Sa longueur atteint 5 μ , et l'on n'y trouve plus trace du corps prolamellaire. Les lamelles vont souvent d'un bout à l'autre du plaste. Elles tendent à s'accoler par deux ou parfois trois comme ce sera le cas dans le chloroplaste achevé (GIBBS, 1960, 1962), formant ainsi cinq ou six groupes de lamelles.

Après 48 heures d'éclairement, le chloroplaste a atteint sa taille définitive. La longueur est de 6 à 7 μ pour une largeur de 1 μ environ. Les lamelles sont associées en 15 à 20 groupes de 3. On y trouve des pyrénoides achevés. Du point de vue structural, il ne manque plus rien à l'organisation du chloroplaste.

2. ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA SOUCHE *al Ly 1*

2.1. STRUCTURE DES PLASTES DE LA SOUCHE *al Ly 1* CULTIVEE A L'OBSCURITE

Leur structure, leur forme et leurs dimensions sont assez proches

de celles des proplastès de la forme étiolée. On y trouve une structure condensée de forme sphérique, similaire aux corps prolamellaires de la forme étiolée (contrairement à ce que l'on voit dans cette dernière, on n'observe jamais plusieurs structures de ce type). Son aspect est parfois plus régulier dans la souche *al Ly 1*, sans toutefois être identique à la structure du corps prolamellaire des Plantes supérieures. On distingue sur les coupes des cercles jointifs d'un diamètre de 200 Å (figure 10a).

On trouve, en outre, dans les plastes de la souche *al Ly 1* cultivée à l'obscurité, de une à trois structures particulières de longueur atteignant 0,5 µ sur une largeur de 0,1 µ environ. L'aspect interne de ces structures est régulier, parcouru par 5 à 10 bandes de structure lamellaire.

Nous désignerons la première de ces structures sous le nom de corps sphérique, la seconde sous le nom de corps strié.

2.2. EVOLUTION DE CES STRUCTURES AU COURS DE L'ECLAIREMENT

2.2.1. Influence des éclairagements inférieurs à 3 heures

Les aspects observés entre 1 heure et 3 heures d'éclairement sont caractérisés par une structure particulière du résidu de système plastidien. Les plastes s'étendent, s'amincissent, atteignant jusqu'à 4 µ de longueur sur 0,1 µ de largeur. Ils présentent souvent l'aspect d'un anneau entourant une zone cytoplasmique ; il semble que ces structures puissent être considérées comme l'aspect en coupe, d'un plaste en forme de cloche à parois minces. Dans certains cas, le plaste apparaît sous une forme ramifiée qui représente peut-être la coupe d'une structure formée par plusieurs cloches à parois coalescentes.

Le corps sphérique est toujours présent. Son aspect est nettement moins régulier. Il présente parfois des expansions formées par des alignements de petites vésicules.

Le corps strié a disparu après une heure d'éclairement. On distingue aussi des groupes de petites vésicules d'un diamètre de 200 à 300 Å environ.

Les différents aspects de ces structures sont représentés dans la figure 10c,d,e,f,.

2.2.2. Influence des éclairagements supérieurs à 3 heures

Après 8 heures d'éclairement, les plastes ont repris une taille identique à celle qu'ils avaient avant l'éclairement. On y voit encore parfois des corps sphériques. Les groupes de petites vésicules s'ordonnent en structures de plus en plus longues qui tendent à prendre l'allure de lamelles (figure 10g).

Après 30 heures d'éclairement, la structure est peu différente. Des lamelles chloroplastiques typiques, groupées par trois, sont parfois rencontrées (figure 10i).

Si la souche *al Ly 1* est cultivée plusieurs mois à la lumière on observe en général la structure représentée figure 10j. On distingue un corps sphérique à structure irrégulière, quelques petits amas de vésicules de 200 à 300 Å, et des lamelles chloroplastiques typiques. Leur structure n'est alors pas très différente de celle des plastes de la souche *al Ly 1* cultivée à l'obscurité.

2.3. ANALYSE DES PIGMENTS DE LA SOUCHE *al Ly 1*

2.3.1. Mise en évidence de la chlorophylle

Que la souche *al Ly 1* soit cultivée à l'obscurité ou à la lumière, on ne détecte jamais, dans les extraits acétoniques, de chlorophylle ou de protochlorophylle. On devait donc se demander si cette souche est capable de synthétiser la chlorophylle. RICHARD (communication personnelle) a observé que *al Ly 1* possède l'ALAdeshydrase en quantité égale à celle des euglènes étiolées. Il semblait donc que le système de synthèse de la chlorophylle existât.

En effet, en cultivant *al Ly 1* sous un éclairage continu de 3.10^{-4} lux, on peut mettre en évidence une concentration de chlorophylle de 9 ± 1 ng par million de cellules. Un éclairage de 400 lux pendant 5 secondes suffit alors à détruire toute trace de chlorophylle. Un éclairage continu de 0,1 lux pendant la culture aboutit également à l'absence de pigments chlorophylliens décelables.

2.3.2. Comparaison du contenu en caroténoïdes de la souche *al Ly 1* et de la souche étiolée

Les résultats précédents conduisaient à penser que l'on pouvait se trouver en présence d'un phénomène de photodestruction de la chlorophylle. Sachant que la protection de la chlorophylle est assurée par certains caroténoïdes, on devait donc vérifier le contenu en caroténoïdes de la souche *al Ly 1*. La figure 11 montre les spectres d'extraits acétoniques obtenus respectivement à partir de la souche étiolée et de la souche *al Ly 1*. Pour ces expériences, les deux souches ont été cultivées à l'obscurité, ensemble et exactement dans les mêmes conditions (culture jusqu'à la phase plateau, puis deux jours de jeûne sur la fraction minérale du milieu de culture).

La comparaison des deux spectres montre, dans la région d'absorption des caroténoïdes, des différences tant sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif.

Les deux souches présentent donc des différences certaines sur le plan de la composition en caroténoïdes.

3. DISCUSSION

3.1. MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ECLAIREMENT CHEZ LA SOUCHE Z ETIOLEE

La qualification en tant que corps prolamellaire, de la structure observée, chez la souche étiolée, repose sur deux catégories d'observations. D'une part, cette structure est présente dans le proplaste d'euglènes étiolées pour disparaître après quelques heures d'éclairement. D'autre part, elle se trouve en continuité avec des lamelles en cours de formation, qui se constituent à ses dépens.

On doit évidemment se demander pourquoi, à l'exception des observations récentes de SCHIFF, les auteurs qui ont étudié les proplastides d'Euglènes n'ont pas vu cette structure. L'explication qui nous paraît la plus vraisemblable rapporte ces différences à l'influence de conditions physiologiques ou génétiques, sur les Euglènes étudiées.

L'influence de l'état physiologique de la souche est démontrée par le fait que la structure du corps prolamellaire diffère selon le stade de croissance de la culture. Si la cellule s'accroît rapidement, la densité du corps prolamellaire reste relativement faible. Ceci fait apparaître la formation de cette structure comme l'expression d'une résultante entre la vitesse de synthèse des matériaux qui la constituent et la vitesse de la multiplication cellulaire. Ceci étant, on imagine aisément que certains états physiologiques, pouvant dépendre, en particulier, de la composition du milieu de culture, établissent entre les éléments de cet équilibre une relation différente de celle que nous avons rencontrée. Parmi les influences physiologiques décrites par d'autres auteurs, notons une observation faite sur un mutant *y-1* de *Chlamydomonas reinhardtii*. A partir d'une forme de ce mutant étiolée par culture constante à l'obscurité, on provoque la naissance d'une formation comparable au corps prolamellaire, par une influence conjointe de l'éclairement et d'inhibiteurs de la protéosynthèse (HOOBER et col., 1969).

Les influences génétiques ont souvent été mises en évidence. Elles sont particulièrement notables chez les mutants *albina* [*Hordeum* (VON WETTSTEIN, 1961) ; *Lycopersicum* (LEFORT, 1959) ; *Zea* (HODGE et col., 1956)] . Ainsi, chez l'orge, le mutant *albina 12* ne forme pas de corps prolamellaire à l'obscurité, tandis qu'il s'en constitue un chez *Albina 20*.

L'évolution du système plastidien après la disparition du corps prola-

mellaire est tout à fait comparable aux descriptions de la littérature (BEL. SHAUL et col., 1964) à part sa plus grande rapidité dans les conditions que nous avons employées.

3.2. COMPARAISONS ENTRE L'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE ET L'EVOLUTION BIOCHIMIQUE DU SYSTEME PLASTIDIEN

L'ensemble des études effectuées jusqu'à présent montre que, sur de nombreux plans, le passage du proplaste au chloroplaste s'effectue de manière continue. Cependant, chacun des processus que l'on peut étudier, montre des variations de vitesse qui permettent, dans une certaine mesure, de distinguer dans cet ensemble, des phases plus ou moins séparées des phases voisines. Dans cet esprit, on peut tenter de distinguer deux périodes au moins dans la morphologie du plaste.

- *La phase terminale.* Il s'agit apparemment de la phase la plus simple au cours de laquelle les divers éléments de la structure et de la physiologie du plaste se développent avec une concordance relativement rigoureuse. On peut estimer que dans les conditions où nous avons opéré, cette phase est engagée au plus tard 5 à 6 heures après le début de l'éclairement. A partir de ce moment, la synthèse des enzymes évolue parallèlement à la synthèse de la chlorophylle ; la production photosynthétique d'oxygène est proportionnelle à la synthèse de chlorophylle (DUPUY, 1969) ; le corps prolamellaire a disparu et les lamelles déjà bien formées continuent à se développer régulièrement. On peut estimer que durant cette phase la structure et le fonctionnement du chloroplaste sont, à certains détails près, essentiellement quantitatifs, similaires à ceux du chloroplaste achevé.

- *La phase de transition.* Nous désignerons par ce nom l'intervalle qui sépare le début de l'éclairement et l'installation de la phase terminale. Durant cette période, on voit se dérouler les synthèses d'enzymes, la synthèse de chlorophylle, la formation des lamelles chloroplastiques, selon des règles plus ou moins parallèles, avec cependant des discordances évidentes. L'étendue de ces discordances peut varier selon les conditions physiologiques de la culture. D'autre part, durant cette période, la production d'oxygène photosynthétique évolue proportionnellement à la quantité de chlorophylle, mais avec des paramètres différents de ceux qui seront suivis dans la phase terminale (DUPUY, 1969). Dans l'état actuel des choses, on doit se borner à constater cette situation qui paraît attester l'édification de nouveaux équilibres. On peut concevoir que les modalités de cette évolution sont différentes selon les conditions physiologiques des cultures. Cette phase apparaît sans doute comme l'une des plus intéressantes à analyser, mais sans doute aussi comme l'une des plus complexes.

3.3. LES STRUCTURES PLASTIDIENNES CHEZ LE MUTANT *al Ly 1*

3.3.1. *Nature du corps sphérique et du corps strié*

Une première question doit être posée. S'agit-il véritablement de structures différentes ? Ou bien représentent-elles seulement des aspects d'une même structure différents selon l'orientation des coupes ? Il semble bien que l'on puisse trancher en faveur d'une distinction. En effet, d'une part on n'observe pas d'allure intermédiaire comme il devrait s'en présenter si une même structure pouvait présenter des aspects différents selon l'orientation des coupes. D'autre part, les lamelles caractéristiques du corps strié devraient, si celui-ci représentait la même entité que le corps sphérique, trouver un correspondant au niveau de ce dernier, ce qui n'est pas le cas.

L'étude de l'évolution de ces structures sous l'influence de l'éclairement plaide également en faveur d'une distinction. En effet, le corps strié disparaît rapidement tandis que le corps sphérique subsiste sous une forme relativement inchangée.

La nature même du corps strié et du corps sphérique peut donner lieu à trois hypothèses :

- aucun des deux n'est homologue du corps prolamellaire ;
- l'un d'entre eux, corps sphérique ou corps strié, correspond au corps prolamellaire ;
- tous deux sont comparables au corps prolamellaire.

La première hypothèse ne peut être rejetée sans réflexion car ni le corps sphérique, ni le corps strié ne conduisent à la formation de lamelles. Et pourtant le corps strié disparaît dès le début de l'éclairement, tandis que le corps sphérique semble réagir à l'action de la lumière par l'émission de petites vésicules qui pourraient être considérées comme des lamelles imparfaites. Ainsi, tous deux présentent une certaine réaction à la lumière.

Si l'on considère que, chez ce mutant, la lumière produit la destruction des pigments chlorophylliens, on pourrait émettre l'hypothèse que cette destruction entraîne (ou suit ?) la destruction des structures lamellaires auxquelles ces pigments sont généralement attachés. Dans ces conditions, on pourrait supposer que le corps strié représente une forme particulière, affectée chez ce mutant, des lamelles que l'on trouve fréquemment dans les proplastides d'euglènes étiolées, et l'on s'expliquerait ainsi sa disparition au début de l'éclairement. Dans cette hypothèse, le corps sphérique pourrait être l'homologue d'un corps prolamellaire dont l'évolution, sous l'influence de la lumière, commencerait à se produire pour avorter rapidement. Les cha-pelets de vésicules auxquels il donne naissance apparaîtraient alors comme

l'équivalent des lamelles formées à partir du corps prolamellaire, condamnées à la dégénérescence aussitôt qu'elles prennent naissance.

Cependant, on doit se demander dans quelle mesure certaines au moins des vésicules alignées que l'on rencontre dans le proplaste ne proviendraient pas du corps strié, ce qui pourrait conduire à considérer le corps strié comme l'homologue d'un corps prolamellaire. Cette hypothèse est à rapprocher du fait que chez l'euglène étiolée un proplaste contient généralement plusieurs corps prolamellaires, tandis qu'une structure plastidienne de *al Ly 1* ne contient jamais qu'un seul corps sphérique. Le corps strié pourrait alors être considéré comme l'homologue d'un second corps prolamellaire. On devrait alors se demander pourquoi ici deux corps prolamellaires adoptent des formes et des propriétés différentes. Une hypothèse simple consiste à envisager la présence d'un constituant du corps sphérique en quantité limitante, l'excédent de matériel lamellaire formant alors les corps striés.

Ainsi, nous parvenons à un ensemble d'hypothèses entre lesquelles les observations actuelles permettent encore difficilement d'opérer un choix.

3.3.2. *Evolution des structures plastidiennes de la souche al Ly 1 au cours de l'éclairement*

L'évolution morphologique des plastes présente une allure extrêmement curieuse. Il semble que l'on ne puisse lui trouver aucune correspondance dans la littérature. Sans que l'on sache interpréter les formes mêmes de cette évolution, la succession des stades évoque l'idée d'une phase d'instabilité au début de l'éclairement, aboutissant, après quelques heures, à un nouvel état stable. Le parallélisme est frappant par rapport aux phases que nous avons définies. plus haut comme phases intermédiaire et phase terminale, dans l'évolution du plaste normal. La phase terminale présenterait ici la particularité d'une ressemblance extrême avec la structure réalisée à l'obscurité, à l'exception du corps strié désormais disparu.

On pourrait interpréter l'existence de la phase intermédiaire comme le témoignage de la présence, au début de l'éclairement, de substances ou de structures, formées à l'obscurité, et dont la sensibilité à la lumière engagerait le chloroplaste dans la voie d'une certaine évolution. Cependant, à la différence des proplastes normaux, cette évolution est abortive, les structures ou les substances en question se trouvant détruites sous l'influence de la lumière. Quelque conjecturale que reste cette construction, on devra se demander dans quelle mesure les substances ou les structures responsables correspondent à des situations à l'oeuvre dans l'évolution du plaste normal.

L'existence de différences entre la forme sauvage et le mutant, au

niveau des caroténoïdes, permet de se demander dans quelle mesure l'instabilité des pigments chlorophylliens et celle des structures qui les portent pourraient résulter de ces différences. Des liaisons de ce genre sont déjà largement connues. Ainsi, on a décrit des mutants de Plantes supérieures qui meurent lorsqu'ils sont exposés à la lumière et où cet effet est attribué à une modification au niveau des caroténoïdes [*Zea* (FALUDI et col., 1964 ; ANDERSON et col., 1960) ; *Helianthus* (WALLES, 1965)]. Chez les bactéries photosynthétiques, une situation analogue se rencontre, compliquée par l'intervention de l'oxygène. Cultivée en aérobiose et éclairée, *Rhodospseudomonas spheroides* perd sa chlorophylle (qu'elle conserve à l'obscurité) et meurt. En anaérobiose, elle conserve sa chlorophylle et survit (GRIFFITH et col., 1955). Ces observations conduiraient à supposer que l'effet primaire de la mutation s'exerce ici sur l'aptitude à produire certains caroténoïdes indispensables à la stabilité de la structure chloroplastique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1. EVOLUTION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DURANT LA MORPHOGENÈSE DU CHLOROPLASTE

- Dans la mesure où nos observations pourraient être généralisées, on aboutirait à la conclusion que les enzymes du cycle de CALVIN, présentes dans le proplaste constitué à l'obscurité, subissent durant l'éclairement une évolution exclusivement quantitative. On notera toutefois que les études de LEWIS et col. (1965) fondées sur l'emploi de méthodes immunochimiques, semblaient indiquer la présence, dans le chloroplaste, d'antigènes nouveaux, absents dans le proplaste : s'agit-il alors d'une véritable apparition d'antigènes nouveaux, ou simplement d'une augmentation quantitative à partir d'une limite que les méthodes immunochimiques, moins sensibles que les tests enzymatiques, ne permettent pas de détecter ?

- Durant les six premières heures d'éclairement, les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase augmentent de 2,5 fois environ selon des rythmes en partie parallèles, relativement indépendants de la synthèse de la chlorophylle. Ces changements d'activité se déroulent même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, ce qui conduit à supposer qu'ils peuvent représenter des activations sans véritable synthèse. A moins d'admettre que la synthèse de ces enzymes comporte plusieurs phases dont la phase terminale pourrait être insensible vis à vis des inhibiteurs employés. Ce qui conduirait à supposer que, dans les euglènes étiolées, on trouve une certaine quantité d'enzymes achevées à laquelle s'ajoute une certaine quantité, partiellement achevée seulement et parvenue au stade où elle est insensible à l'influence des inhibiteurs.

D'une façon générale, les évolutions visibles durant les six premières heures d'éclairement correspondent à une altération des équilibres antérieurs et comportent des réactions liées aux conditions physiologiques de la culture. C'est seulement après six heures d'éclairement que paraît établi le comportement caractéristique des euglènes photosynthétiques.

- Les résultats obtenus en employant les inhibiteurs tendent à confirmer ceux de BOVARICK et col. (1970), en opposition avec ceux de SMILLIE et col. (1967). Les deux enzymes que nous avons étudiées seraient donc synthétisées sur les ribosomes cytoplasmiques. Il nous faut pourtant dire, que l'emploi d'inhibiteurs seuls ne saurait conduire à des interprétations définitives. En effet, il n'est pas prouvé que leur spécificité soit absolue. En outre, les divers compartiments cellulaires ne sont pas indépendants et le fait d'en déséquilibrer un doit certainement avoir une influence sur les autres.

En ce qui concerne la localisation des ADN portant les codes, ni l'emploi de l'actinomycine D, ni celui de la rifampicine ne nous ont donné d'informations que nous puissions considérer comme valables. Nous avons rencontré sur ce point des difficultés qu'il faudra tenter de surmonter.

2. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES SOUCHES ETIOLEES ET *et 1*

La structure du corps prolamellaire observée chez les euglènes réversiblement étiolées est légèrement différente de celle des corps prolamellaires des Plantes supérieures. Elle dépend de l'état physiologique de la cellule.

La souche définitivement blanchie possède un résidu de système chloroplastique, sensible à une stimulation lumineuse. La formation de chlorophylle, sous des éclaircissements très faibles, permet de penser que, dans certaines conditions, l'évolution morphologique de ce mutant, sous l'influence de la lumière, pourrait être différente de celle que nous avons vue. Pour analyser ces structures sur le plan morphologique, il faudrait d'abord définir les conditions qui permettent une synthèse relativement élevée de chlorophylle.

Nous avons observé que ce mutant possède un contenu en caroténoïdes différent de la souche sauvage. Des analyses plus précises devront être faites concernant la nature des caroténoïdes en cause et leur intervention possible dans la morphogenèse plastidienne.

Ces travaux, qu'ils soient morphologiques ou enzymatiques, apportent des résultats et des techniques qui pourront être utilisés tant dans l'étude de la souche sauvage que dans la caractérisation et l'analyse de mutants que l'on sera ultérieurement conduit à isoler.

B I B L I O G R A P H I E

- ANDERSON I.C., ROBERTSON D.S., 1960. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction.
Plant Physiol., 35, 531-534.
- ANDERSON L.A., SMILLIE R.M., 1966. Binding of chloramphenicol by ribosomes from chloroplasts.
Bioch. Bioph. Res. Comm., 23, 535-539.
- ARNON D.I., 1959. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.
Plant Physiol., 24, 1-15.
- BEN-SHAUL Y., SCHIFF J.A., EPSTEIN H.T., 1964. Studies of chloroplast development in *Euglena*. VII. Fine structure of the developing plastid.
Plant Physiol., 39, 231.
- BOVARNICK J.G., ZELDIN M.H., SCHIFF J.A., 1969. Differential effects of actinomycin D on cell division and light induced chloroplast development. in *Euglena*.
Develop. Biol., 19, 321-340.
- BOVARNICK J.G., FREEDMAN Z., SCHIFF J.A., 1970. Cellular origins of chloroplast enzymes in *Euglena*.
Plant Physiol. Abstr., 46, suppl. 21.
- BRAWERMANN G., KONIGSBERG N., 1960. On the formation of the TPN requiring glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase during the production of chloroplast in *Euglena gracilis*.
Bioch. Bioph. Acta, 43, 374.

- BRAWERMAN G., EISENSTADT J.M., 1964. Template and ribosomal ribonucleic acid associated with the chloroplasts and the cytoplasm of *Euglena gracilis*. *J. Mol. Biol.*, 10, 403-411.
- BRONCHART R., 1970. Une nouvelle interprétation de la structure du corps prolamellaire basée sur des observations en cryodécapage. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 270, 1789.
- BROWN R.D., BASTIA D., HASELKORN R., 1970. Effect of rifampicin on transcription in chloroplasts of *Euglena*. *Lepetit Colloquia on biology and medicine.1. RNA polymerase and transcription*. Ed. by SILVESTRI, 309-328.
- Mc CALLA D.R., ALLAN R.K., 1964. Effect of actinomycin D on *Euglena* chloroplast formation. *Nature*, 201, 504-505.
- CHEN S., Mc MAHON D., BOGORAD L., 1967. Early effects of illumination on the activity of some photosynthetic enzymes. *Plant Physiol.*, 42, 1-5.
- DION M., 1968. Influence de l'éclairement sur la synthèse de chlorophylle et la multiplication cellulaire chez des populations d'euglènes étiolées. *Thèse 3ème Cycle, Lyon*.
- DUPUY J., 1969. Contribution à l'étude de la différenciation d'*Euglena gracilis* sous l'influence de la lumière. *Thèse 3ème Cycle, Lyon*.
- ENNIS H.L., LUBIN M., 1964. Cycloheximide : Aspect of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science*, 146, 1474.
- FALUDI-DANIEL A., LANG F., FRADKIN L.I., 1964. The state of chlorophyll a in leaves of carotenoid mutant maize. *Symp. Biochem. of Chloroplast*, ed. by GOODWIN, I, 269-274.
- FREYSSINET G., 1969. Evolution des synthèses d'ARN chez des euglènes étiolées soumises dans diverses conditions à l'influence de la lumière. *Thèse de 3ème cycle, Lyon*.

GALE E.F., 1963. Mechanisms of antibiotic action.

Pharmacol. Rev., 15, 481.

GIBBS M., 1955. TPN triose phosphate dehydrogenase from plant tissue.

Methods in Enzymology, ed by COLOWICK et KAPLAN, I, 411.

GIBBS S.P., 1960. The fine structure of *Euglena gracilis* with special reference to the chloroplasts and pyrenoids.

J. Ultra. Res., 4, 127-148.

GIBBS S.P., 1962. The ultrastructure of chloroplasts algae.

J. Ultra. Res., 7, 418-435.

GOODENOUGH U.W., LEVINE R.P., 1970. Chloroplast structure and function in ac 20, a mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Chloroplast ribosomes and membrane organization.

J. Cell Biol., 44, 547.

GREENBLATT C.L., SCHIFF J.A., 1959. A pheophytin-like pigment in dark-adapted

Euglena gracilis. *J. Protozool.*, 6, 23-28.

GRIFFITH S.M., SISTROM N.R., COHEN-BAZIRE G., STANIER R.Y., 1955. Function of carotenoid in photosynthesis.

Nature, 176, 1211.

GUNNING B.E.S., 1965. The greening process in plastid. I. The structure of the prolamellar body.

Protoplasma, 61, 111-130.

HARTMANN G., HONIKEL K.O., KNÜSEL F., NÜESCH J., 1967. The specific inhibition of the DNA directed RNA synthesis by rifamycin.

Biochim. Biophys. Acta, 145, 843.

HEBER U., PON N.G., HEBER N., 1963. Localization of carboxydismutase and triose phosphate dehydrogenase in chloroplasts.

Plant Physiol., 38, 355.

HEIZMANN P., 1967. Recherches sur le métabolisme des acides ribonucléiques au cours du verdissement chez *Euglena gracilis*.

Thèse de docteur-ingénieur, Lyon.

- HEIZMANN P., 1970. Propriétés des ribosomes et des acides ribonucléiques ribosomiques d'*Euglena gracilis*.
Bioch. Bioph. Acta, 224, 144-154.
- HODGE A.J., Mc LEAN J.D., MEKCEK F.V., 1956. A possible mechanism for the morphogenesis of lamella system in plant cells.
J. Bioph. Bioch. Cytol., 2, 597-608.
- HOOBER J.K., SIEKEVITZ P., PALADE G.E., 1969. Formation of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* γ -1. Effect of inhibitors of protein synthesis.
J. Biol. Chem., 244, 2621.
- HURWITZ J., 1962. Phosphoribulokinase.
Methods in Enzymology, ed. by COLOWICK-KAPLAN, 5, 258.
- HUTNER S.H., PROVASOLI L., 1951. The phytoflagellates.
Biochemistry and Physiology of Protozoa, ed. by LWOFF A., Acad. Press N.Y., 1, 27-128.
- KLEIN S., BRYAN G., BOGORAD L., 1964. Early stages in the development of plastid fine structure in red and far red light.
J. Cell Biol., 22, 433-442.
- LEFORT M., 1959. Sur la présence d'un centre plastidial dans les chloroplastes d'*Elodea canadensis*.
Rev. gén. Bota., 66, 461-465.
- LEFORT M., 1959. Etude de quelques mutants chlorophylliens induits chez *Lycopersicon esculentum*. Analyse des pigments et de l'infrastructure des chloroplastes normaux et altérés.
Rev. cytol. Biol. Veg., 20, 1-159.
- LEFORT M., 1962. Etude de l'infrastructure plastidiale d'un mutant chlorophyllien de *Chlorella vulgaris*.
C.R. Acad. Sc. Paris, 254, 2414-2416.
- LEMOINE Y., 1968. Evolution du chloroplaste étiolé au cours du verdissement chez le haricot.
J. Microscopie, 7, 755.

- LEWIS S.C., SCHIFF J.A., EPSTEIN H.T., 1965. Chloroplast antigens and their appearance during chloroplast development.
J. Protozool., 12, 281.
- MOYSE A., 1967. L'assimilation photosynthétique du CO₂.
Traité de biochimie générale, 3, 209.
- MULLER B., ZIEGLER I., ZIEGLER H., 1969. Reversible photoinduced increase in NADP dependent 3 phospho glyceraldehyde dehydrogenase activity in chloroplasts. Reaction mechanism.
Eur. J. Bioch., 9, 101.
- NIGON V., HEIZMANN P., DION M., PORTIER C., 1967. Etude cinétique des modifications induites par l'éclairement chez des populations d'Euglènes étiolées.
Bull. Soc. Franç. Physiol. Veget., 13, 233-249.
- PASCAL J.P., 1968. Etude sur la cinétique du verdissement à la lumière d'une population étiolée d'*Euglena gracilis*.
Thèse de 3ème Cycle, Lyon.
- POGO B.G., POGO A.O., 1964. DNA dependence of plastid differentiation. Inhibition by actinomycin D.
J. Cell Biol., 22, 296-301.
- PORTIER C., 1967. Etude des structures ribonucléiques chez une forme blanche d'*Euglena gracilis*.
Thèse de 3ème Cycle, Lyon.
- REYNOLDS E.S., 1963. The use of Lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol., 17, 208-213.
- RICHARDSON K.C., JARRET L., FINKE E.H., 1960. Embedding in epoxy resin for ultrathin sectioning in electron microscopy.
Stain Technol., 35, 313-323.
- SCHIFF J.A., 1969. Developmental interactions among cellular compartments in *Euglena*.
Symposia of the Society for experimental Biology, XXIV, 274.
Control of organelle development.

- SMILLIE R.M., 1962. Formation and function of soluble proteins in *Euglena*
Can. J. Botany, 41, 123-159.
- SMILLIE R.M., EVANS W.R., LYMAN H., 1963. Metabolic events during the formation of a photosynthetic from a non-photosynthetic cell.
Brooklyn Symp. Bull., 16, 89-108.
- SMILLIE R.M., GRAHAM D., DWYER M., GRIEVE A., TOBIN N., 1967. Evidence for the synthesis *in vivo* of proteins of the CALVIN cycle and photosynthesis electron transfer pathway on chloroplast ribosomes.
Bioch. Bioph. Res. Com., 28, 609.
- SPENCER D., 1965. Protein synthesis by isolated chloroplasts.
Arch. Bioch. Bioph., 111, 381.
- STERN A.I., SCHIFF J.A., EPSTEIN H.T., 1964. Studies of chloroplast development in *Euglena*. V. Pigments biosynthesis, photosynthetic oxygen evolution and carbon dioxide fixation during chloroplast development.
Plant Physiol., 39, 220-225.
- VERDIER G., 1969. Synthèse des ARN et de la chlorophylle au cours de l'éclaircissement de cultures d'*Euglena gracilis* étiolées.
Thèse de 3ème Cycle, Lyon.
- WALLES B., 1965. Use of biochemical mutants in analyses of chloroplast morphogenesis.
Symp. Biochem. of chloroplasts. Ed. GOODWIN, II, 633-654.
- WARBURG O., 1938. Chemische Konstitution von fermenten.
Ergeb. Enzymforsch., 7, 210.
- WEHRLI W., KNÜSEL F., SCHMID K., STAEHELIN M., 1968. Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase.
Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y., 61, 667.
- WEHRLI W., NÜESCH J., KNÜSEL F., STAEHELIN M., 1968. Action of rifamycin on RNA polymerase.
Bioch. Bioph. Acta, 157, 215.

WETTSTEIN D. von, 1961. Nuclear and cytoplasmic factors in development of chloroplast structure and function.

Can. J. Botany, 39, 1537-1545.

T A B L E A U X
E T
F I G U R E S
H O R S - T E X T E

TABLEAU I : Action de la cycloheximide au cours de l'éclairement de cultures préparées selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire). La cycloheximide a été ajoutée 16 heures avant le début de l'éclairement (4 répétitions).

Les nombres donnés après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules	
	Témoin	+ cycloheximide	Témoin	+ cycloheximide
0	0,70 ± 0,4	0,75 ± 0,4	0,80 ± 0,4	0,85 ± 0,4
3	1,45 ± 0,4	1,50 ± 0,4	1,50 ± 0,4	1,50 ± 0,4
6	1,70 ± 0,4	1,60 ± 0,4	2,00 ± 0,4	1,90 ± 0,4
9	4,60 ± 1,0	1,65 ± 0,4	2,75 ± 0,4	1,85 ± 0,4
24	15,60 ± 2,0	1,70 ± 0,4	8,20 ± 1,0	1,90 ± 0,4
72	20,00 ± 2,0	1,65 ± 0,4	9,20 ± 1,0	1,80 ± 0,4

TABLEAU 1 bis : Action de la cycloheximide sur l'augmentation des activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase provoquée par l'éclairement chez la souche *al Ly 1* (2 répétitions).

Les nombres indiqués après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules	
	Témoin	+ cycloheximide	Témoin	+ cycloheximide
0	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,04
6	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,04
24	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04

TABLEAU II : Action du chloramphénicol au cours de l'éclairement de cultures préparées selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire). Le chloramphénicol a été ajouté 16 heures avant le début de l'éclairement (4 répétitions).
Les nombres indiqués après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5%.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule	
	Témoïn	+ chloramphénicol	Témoïn	+ chloramphénicol	Témoïn	+ chloramphénicol
0	0,70 ± 0,4	0,60 ± 0,4	0,80 ± 0,4	0,75 ± 0,4	0	0
3 •	1,45 ± 0,4	1,60 ± 0,4	1,50 ± 0,4			
6	1,70 ± 0,4	1,80 ± 0,4	2,00 ± 0,4	2,20 ± 0,4		
9	4,60 ± 1,0	4,10 ± 1,0	2,75 ± 0,4			
24	15,60 ± 2,0	15,20 ± 2,0	8,20 ± 1,0	7,40 ± 1,0	16,8 ± 3,0	9,3 ± 3,0
72	20,00 ± 2,0	19,00 ± 2,0	9,20 ± 1,0	9,40 ± 1,0	20,4 ± 3,0	12,3 ± 3,0

TABLEAU III: Action de l'actinomycine D au cours de l'éclairement de cultures préparées selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire). L'actinomycine D a été ajoutée 16 heures avant le début de l'éclairement (4 répétitions).
Les nombres indiqués après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules				Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules				Multiplication cellulaire photoinduite en %				Chlorophylle en pg/cellule				
	Témoin	+ actinomycine			Témoin	+ actinomycine			Témoin	+ actinomycine			Témoin	+ actinomycine			
		10 γ	50 γ			10 γ	50 γ			10 γ	50 γ			10 γ	50 γ		
			0,65 ± 0,4	0,60 ± 0,4			0,75 ± 0,4	0,75 ± 0,4			0 0	0 0			14,3 ± 3	14 ± 3	16,8 ± 3
0	0,7 ± 0,4				0,8 ± 0,4				0					0			0
24	15,6 ± 2	15 ± 2	14 ± 2		8,2 ± 1	8 ± 1	8,2 ± 1		0 + 2					16,8 ± 3	14,3 ± 3	14 ± 3	
48	19 ± 2	19 ± 2	21 ± 2		9 ± 1	9 ± 1	10 ± 1		25 ± 5	12 ± 5	9 ± 5		20,4 ± 3	17 ± 3			

TABLEAU IV : Action de la rifampicine au cours de l'éclairement de cultures préparées selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire). La rifampicine a été ajoutée 16 heures avant le début de l'éclairement (4 répétitions).
Les nombres donnés après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules			Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules			Multiplication cellulaire photoinduite en %			Chlorophylle en pg/cellule		
	Témoin	+ rifampicine		Témoin	+ rifampicine		Témoin	+ rifampicine		Témoin	+ rifampicine	
		20 γ	200 γ		20 γ	200 γ		20 γ	200 γ		20 γ	200 γ
0	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,75 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,83 ± 0,4	0	0	0	0	0	0
24	15,6 ± 2	17 ± 2	17 ± 2	8,2 ± 1	9,8 ± 1	9,7 ± 1	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2	16,8 ± 3	16,6 ± 3	11,8 ± 3
72	20 ± 2	19,5 ± 2	17,5 ± 2	9,2 ± 1	8,7 ± 1	7,7 ± 1	28 ± 5	20 ± 5	- 15 ± 5	20,4 ± 3	19 ± 3	12,5 ± 3

TABLEAU V : Action de la cycloheximide ajoutée après 6 heures du verdissement d'une culture préparée selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire) (2 répétitions).
Les nombres donnés après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heure	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule		Multiplication cellulaire photoinduite en %	
	Témoïn	+ cycloheximide	Témoïn	+ cycloheximide	Témoïn	+ cycloheximide	Témoïn	+ cycloheximide
6	1,70 ± 0,4	1,65 ± 0,6	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,5	0	
24	15,6 ± 2	2,8 ± 0,6	8,2 ± 1	2,2 ± 0,6	16,8 ± 3	3,8 ± 0,5	0 + 2	0 + 2
48	19 ± 2	4,2 ± 1	9 ± 1	2,8 ± 0,6	19,8 ± 3	7,6 ± 3	25 ± 5	8 ± 5
96	21 ± 2	6,1 ± 1	9,2 ± 1	3,6 ± 1	22 ± 3	10,7 ± 3	30 ± 5	10 ± 5

TABLEAU VI : Action du chloramphénicol ajouté après 6 heures du verdissement d'une culture préparée selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire) (2 répétitions).

Les nombres donnés après les signes $\pm$ sont les intervalles de confiance de la moyenne, au risque 5 %.

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule		Multiplication cellulaire photoinduite en %	
	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.
6	1,7 ± 0,4	1,75 ± 0,6	2 ± 0,4	1,9 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,25 ± 0,5	0	
24	15,6 ± 2	15,1 ± 2	8,2 ± 1	7,8 ± 1	16,8 ± 3	15,2 ± 3	0 ± 2	0 ± 2
48	19 ± 2	18 ± 2	9 ± 1	9 ± 1	19,8 ± 3	19,2 ± 3	25 ± 5	20 ± 5
96	21 ± 2	22 ± 2	9,2 ± 1	9,3 ± 1	22 ± 3	20 ± 3	30 ± 5	25 ± 5

C.A.M. = Chloramphénicol

TABLEAU VII : Action du chloramphénicol sur un verdissement effectué en phase exponentielle (moyenne de 2 répétitions).

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule		Population en 10 ⁶ cell/ml	
	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.	Témoïn	+ C.A.M.
- 16							1,46	1,46
0	0,70 ± 0,4	0,80	0,80 ± 0,4	0,85	0	0	2,46	1,69
6	1,70 ± 0,4	2	2,0 ± 0,4	2,3	1,2 ± 0,5	0,9	2,66	1,76
24	15,6 ± 2	17	8,2 ± 1	9	16,8 ± 3	14	4,09	1,87
72	20 ± 2	21	9,2 ± 1	10	20,4 ± 3	21	6,22	5,66

C.A.M. = Chloramphénicol

TABLEAU VIII : Action de l'actinomycine D (à la dose de 50 γ /ml) sur un verdissement effectué en phase exponentielle (moyenne de 2 répétitions).

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule		Population en 10 ⁶ cell/ml	
	Témoin	+ actinomycine	Témoin	+ actinomycine	Témoin	+ actinomycine	Témoin	+ actinomycine
- 16							1,46	1,46
0	0,7 ± 0,4	0,85	0,80 ± 0,4	0,9	0	0	2,46	2,10
6	1,7 ± 0,4	1,7	2 ± 0,4	1,9	1,2 ± 0,5	1,25	2,66	2,20
24	15,6 ± 2	17	8,2 ± 1	9	16,8 ± 3	18	4,09	3,30
72	20 ± 2	23	9,2 ± 1	10,5	20,4 ± 3	22	6,22	4,39

TABLEAU IX : Action de la rifampicine (à la dose de 20 γ /ml) sur un verdissement effectué en phase exponentielle (moyenne de deux répétitions).

Temps d'éclairement en heures	Activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10 ⁹ cellules		Activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10 ⁹ cellules		Chlorophylle en pg/cellule		Population en 10 ⁶ cell/ml	
	Témoin	+ rifampicine	Témoin	+ rifampicine	Témoin	+ rifampicine	Témoin	+ rifampicine
- 16							1,46	1,46
0	0,70 ± 0,4	0,85	0,80 ± 0,4	0,79	0	0	2,46	2,33
6	1,7 ± 0,4	1,50	2,0 ± 0,4	2,1	1,2 ± 0,5	1,10	2,66	2,60
24	15,6 ± 2	15	8,2 ± 1	8,5	16,8 ± 3	17	4,09	3,81
72	20 ± 2	20	9,2 ± 1	9,5	20,4 ± 3	20	6,22	6,33

TABLEAU X : Inhibition de divers processus sous l'influence des inhibiteurs dans diverses conditions. Synthèse des résultats de ce travail et des données de la littérature.

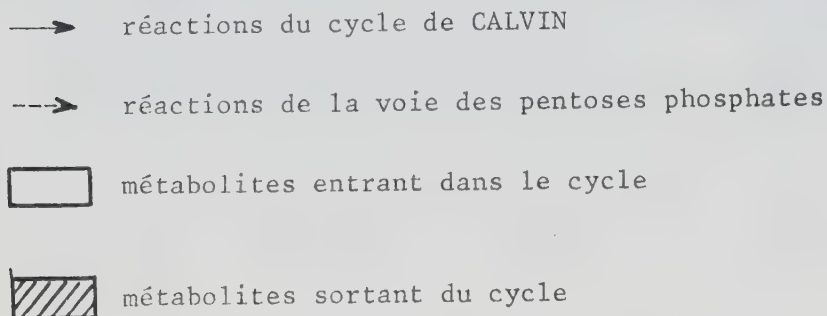
Les chiffres indiquent les pourcentages d'inhibition par rapport aux témoins. Un chiffre précédé du signe - correspond en fait à une augmentation non à une inhibition.

AUTEURS	PHENOMENES ETUDIES	C.A.M. en mg/ml		ACTINOMYCINE en /ml						CYCLO.	
		1	2	3	10	20	30	45	50	15	30
PASCAL 1968	Synthèse de la chlo- rophyllle en phase stationnaire après x heures d'éclaire- ment 3		45								60
POGO 1964	33				31	31					
VERDIER 1969	48	53	70		17				18		
SALVADOR 1971	48				15				18		
McCALLA 1964	60						44		45		
SALVADOR 1971	72	45								99	
SMILLIE 1967	72	82								75	
BOVARNICK 1969	96				12			60			
SALVADOR 1971	Multiplication cellu- laire en phase expo- nentielle après 72 h d'éclairement	0							40		
VERDIER 1969					45				100		
BOVARNICK 1969				40					90		
POGO 1964					84				100		
SALVADOR 1971	Activité de la glycé- raldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP après 72 heures d'éclairement en pha- se stationnaire	0			0				0	95	
SMILLIE 1967		82								-12	

C.A.M. = chloramphénicol

CYCLO = cycloheximide

FIGURE 1 : Représentation du cycle de CALVIN : fixation photosynthétique du CO₂, et de la voie des pentoses phosphates



Enzymes intervenant dans les cycles :

- A : carboxydismutase ou ribulose diphosphate carboxylase
- B : carboxydismutase ou ribulose diphosphate carboxylase
- C : phosphoglycerokinase
- D : glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP
- E : triose phosphate isomérase
- F : aldolase
- G : fructose 1-6 diphosphatase alcaline
- H : transcétolase
- I : transaldolase
- J : phosphatase
- K : transcétolase
- L : phosphopentose isomérase
- M : phosphocétopentose épimérase
- N : phosphoribulokinase
- O : 6 phosphoglucoxydase
- P : 6 phosphogluconate oxydase

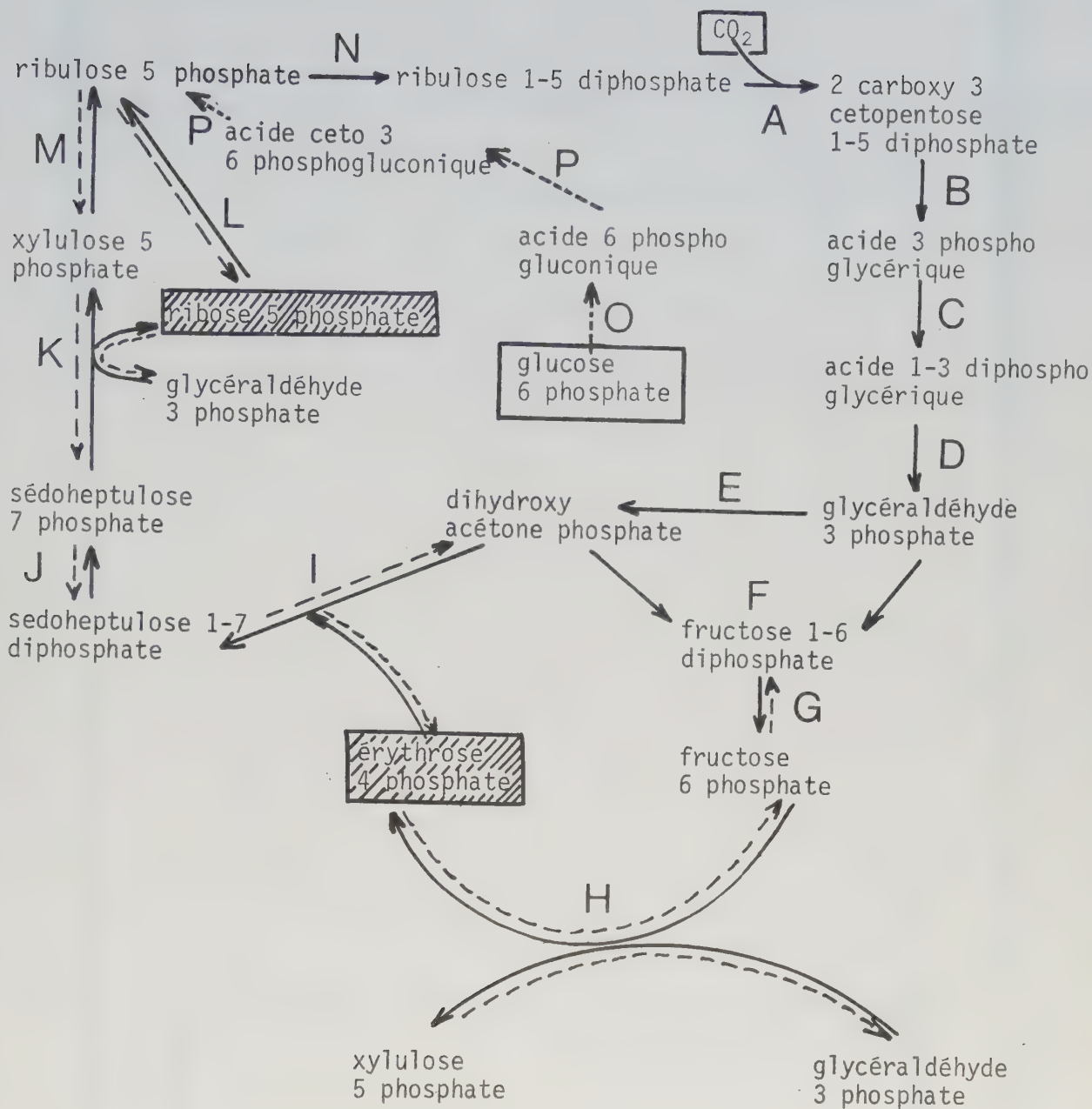


FIGURE 2 : Dispositif permettant d'obtenir de très faibles éclairagements

- A : filtres Wratten neutres Kodak
- B : boîte en carton noir de $180 \times 180 \times 300$ mm
- C : boîte en carton noir de $145 \times 145 \times 90$ mm
- D : fiole en verre contenant la culture d'euglènes

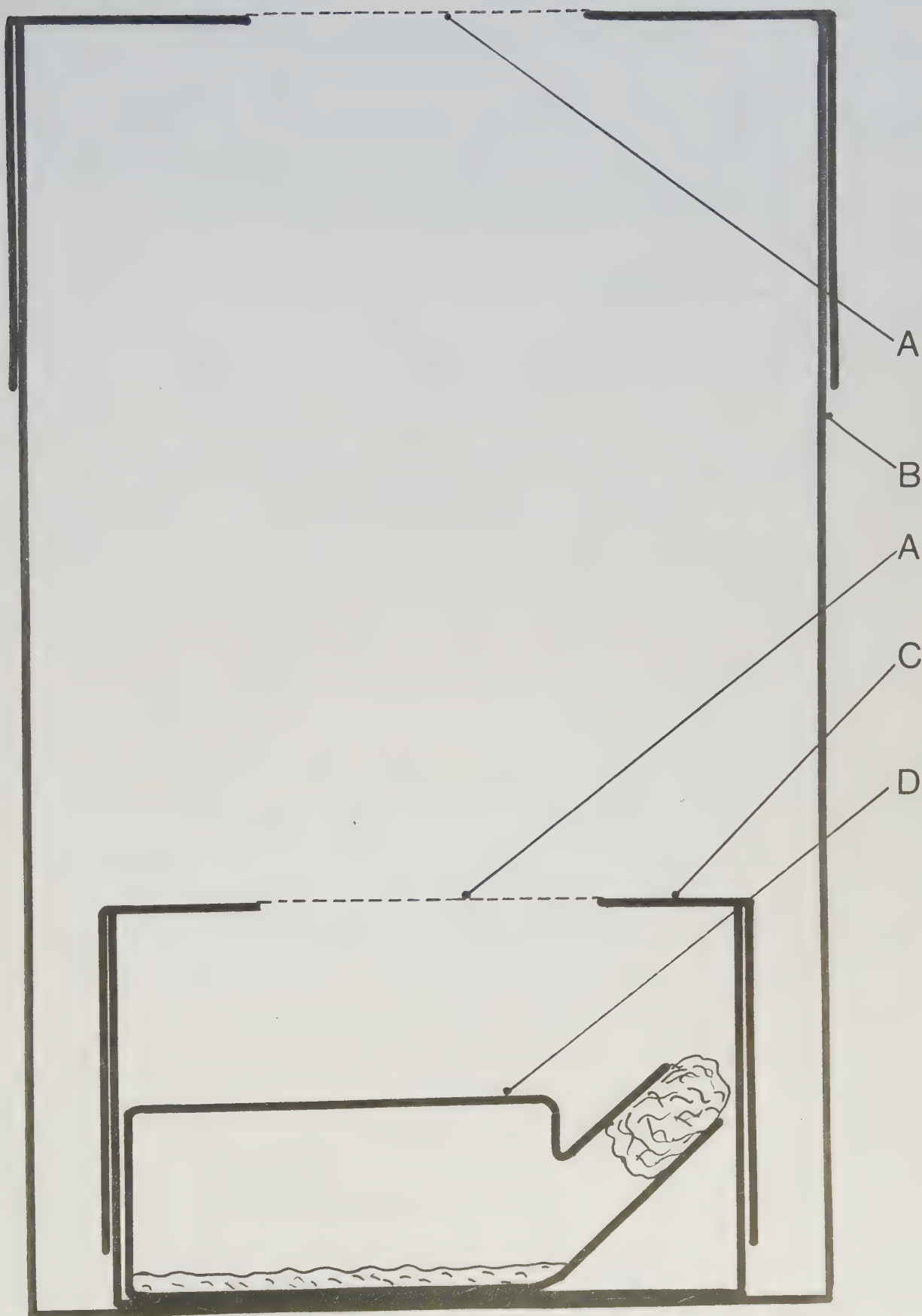


FIGURE 3 : Evolution de la concentration cellulaire de chlorophylle et de paramylon dans les conditions de culture et d'éclairement employées pour les expériences de microscopie électronique

★—★ quantité de paramylon en pg par cellule

□---□ quantité de chlorophylle en pg par cellule

Chlorophylle en pg/cell.

paramylon en pg/cell.

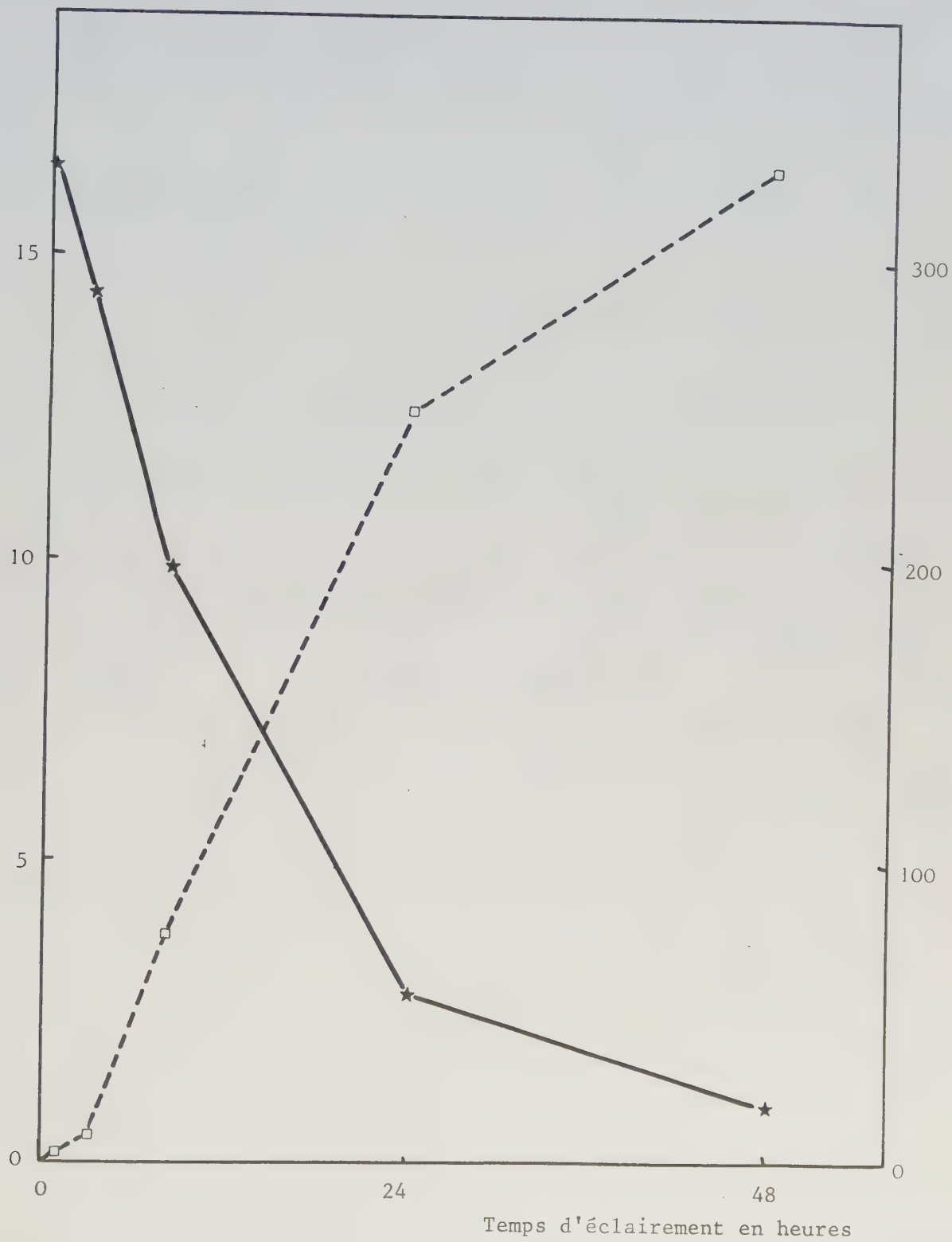


FIGURE 4 : Evolution des activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase au cours de l'éclairement

A : culture préparée selon la modalité A = présence d'ammonium pendant la phase stationnaire (6 répétitions)

B : culture préparée selon la modalité B = absence d'ammonium pendant la phase stationnaire (6 répétitions)

●---● activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.

★—★ activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell.

□---□ quantité de chlorophylle en pg par cell.

┌
└─┬─┘ ce segment représente l'intervalle de confiance de la
moyenne au risque 5 %

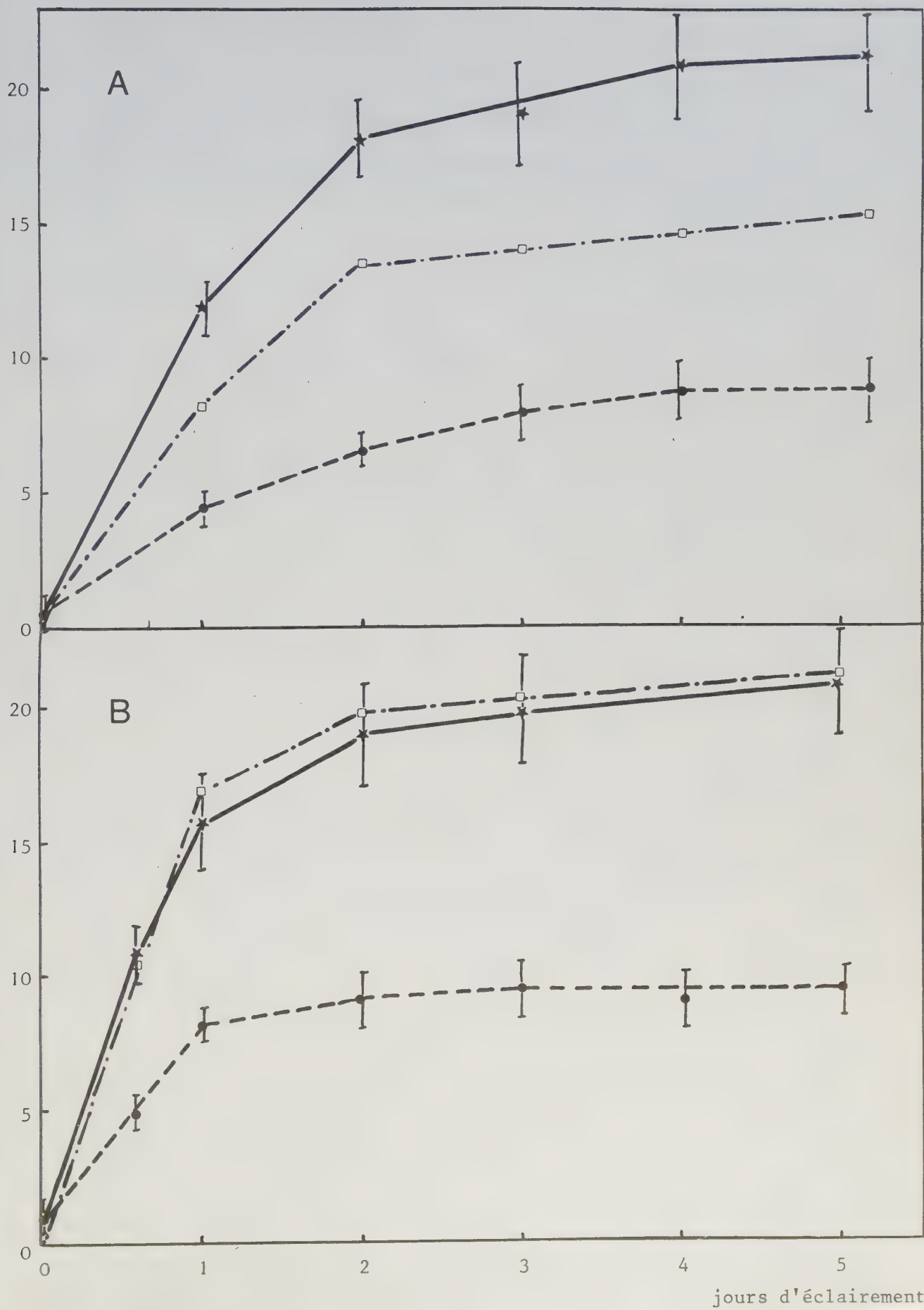


FIGURE 5 : Corrélation entre la quantité de chlorophylle et respectivement l'activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et celle de la ribulose 5 phosphate kinase

Culture préparée selon la modalité A = présence d'ammonium pendant la phase stationnaire

Culture préparée selon la modalité B = absence d'ammonium pendant la phase stationnaire

○—○ activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.
dans une culture préparée selon la modalité A

★—★ activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell., dans une culture préparée selon la modalité A

□—□ activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.
dans une culture préparée selon la modalité B

●—● activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell., dans une culture préparée selon la modalité B

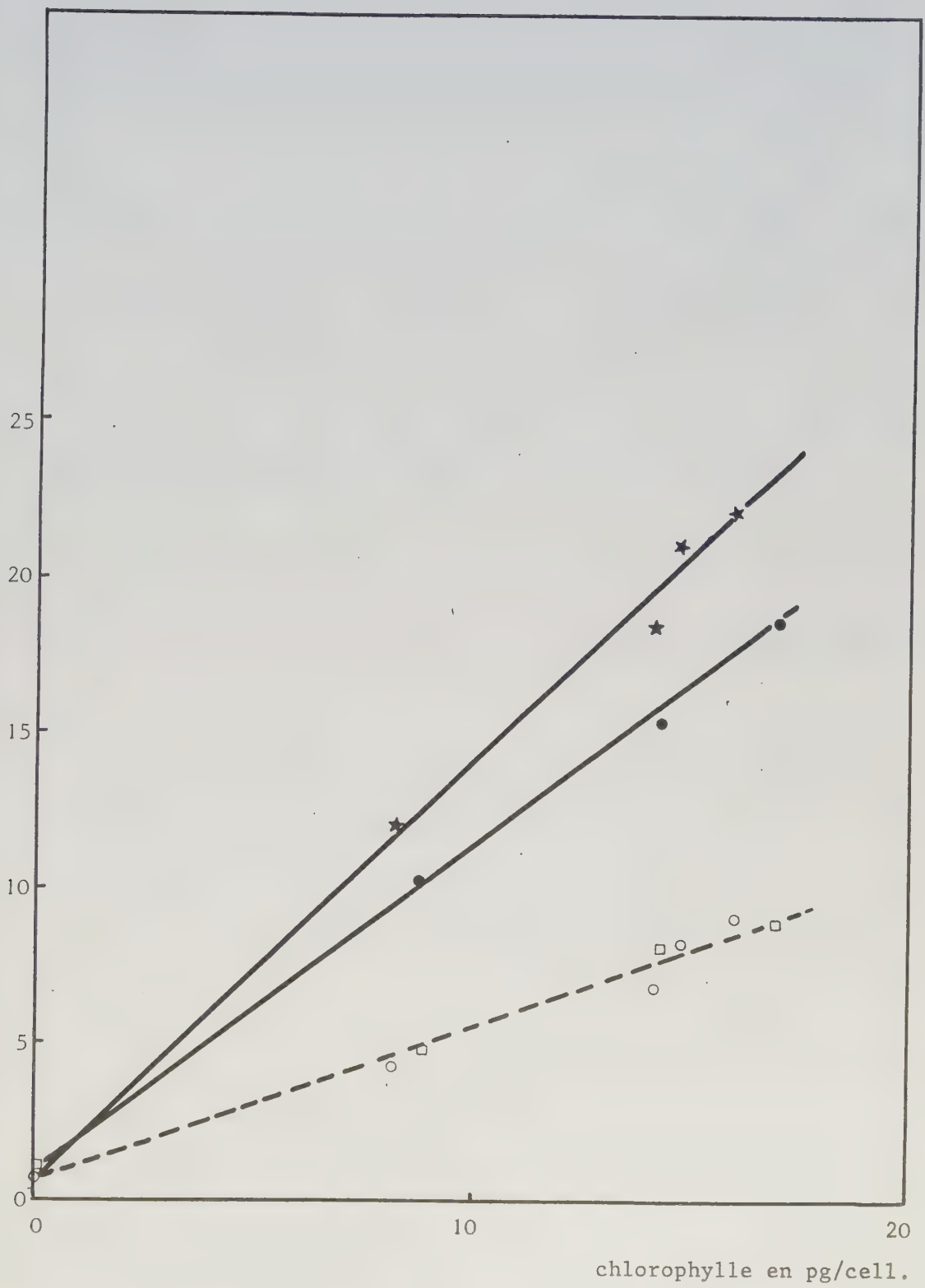


FIGURE 6 : Evolution des activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase au cours des premières heures de l'éclairement

A : culture préparée selon la modalité A = présence d'ammonium pendant la phase stationnaire (10 répétitions)

B : culture préparée selon la modalité B = absence d'ammonium pendant la phase stationnaire (10 répétitions)

●---● activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.

★—★ activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell.

□—□ quantité de chlorophylle en pg/cell.

┌
└—★ ce segment représente l'intervalle de confiance de la
moyenne au risque 5 %

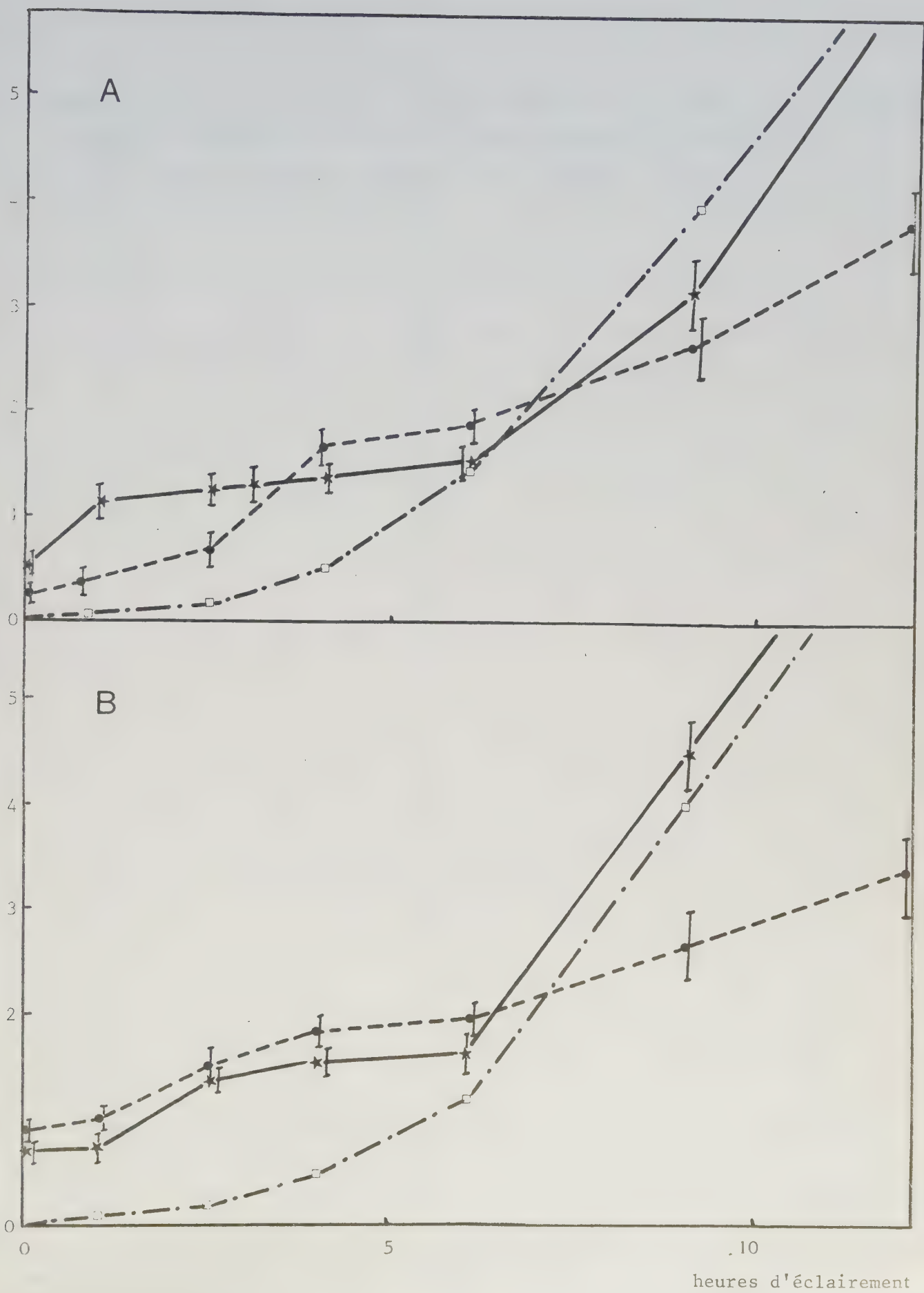


FIGURE 7 : Influence d'un éclaircissement sur les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase chez un mutant définitivement blanchi d'euglène.

★—★activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.

□—□activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell.

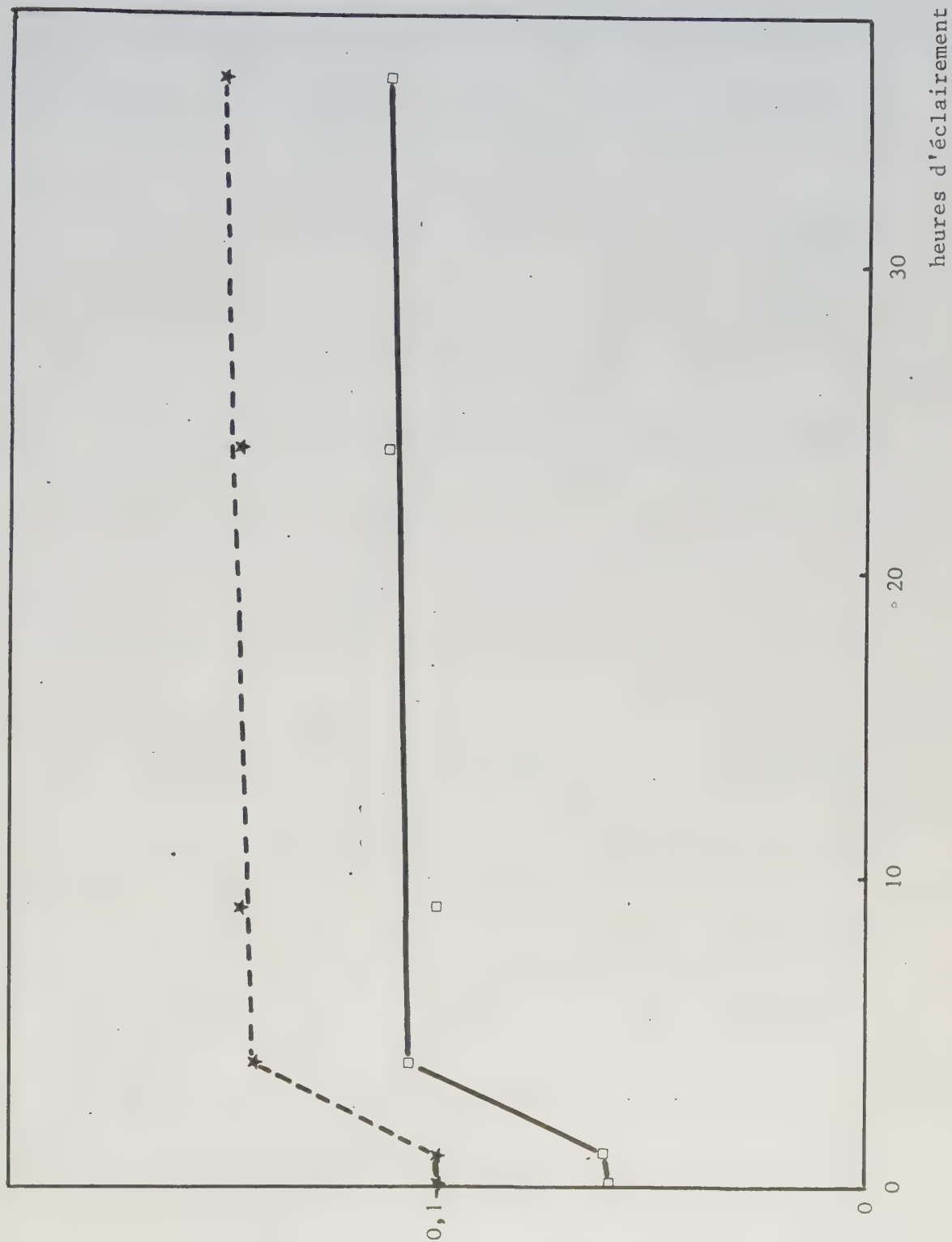


FIGURE 8 : Influence d'un éclaircissement discontinu sur les activités de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP et de la ribulose 5 phosphate kinase de cultures préparées selon la modalité B (pas d'ammonium pendant la phase stationnaire)

●---● activité de la ribulose 5 phosphate kinase en U/10⁹ cell.

★---★ activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP en U/10⁹ cell.

□---□ quantité de chlorophylle en pg/cell.

●---● activité de la ribulose 5 phosphate kinase après retour à l'obscurité

★---★ activité de la glycéraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase à NADP après retour à l'obscurité

□---□ taux de chlorophylle après retour à l'obscurité

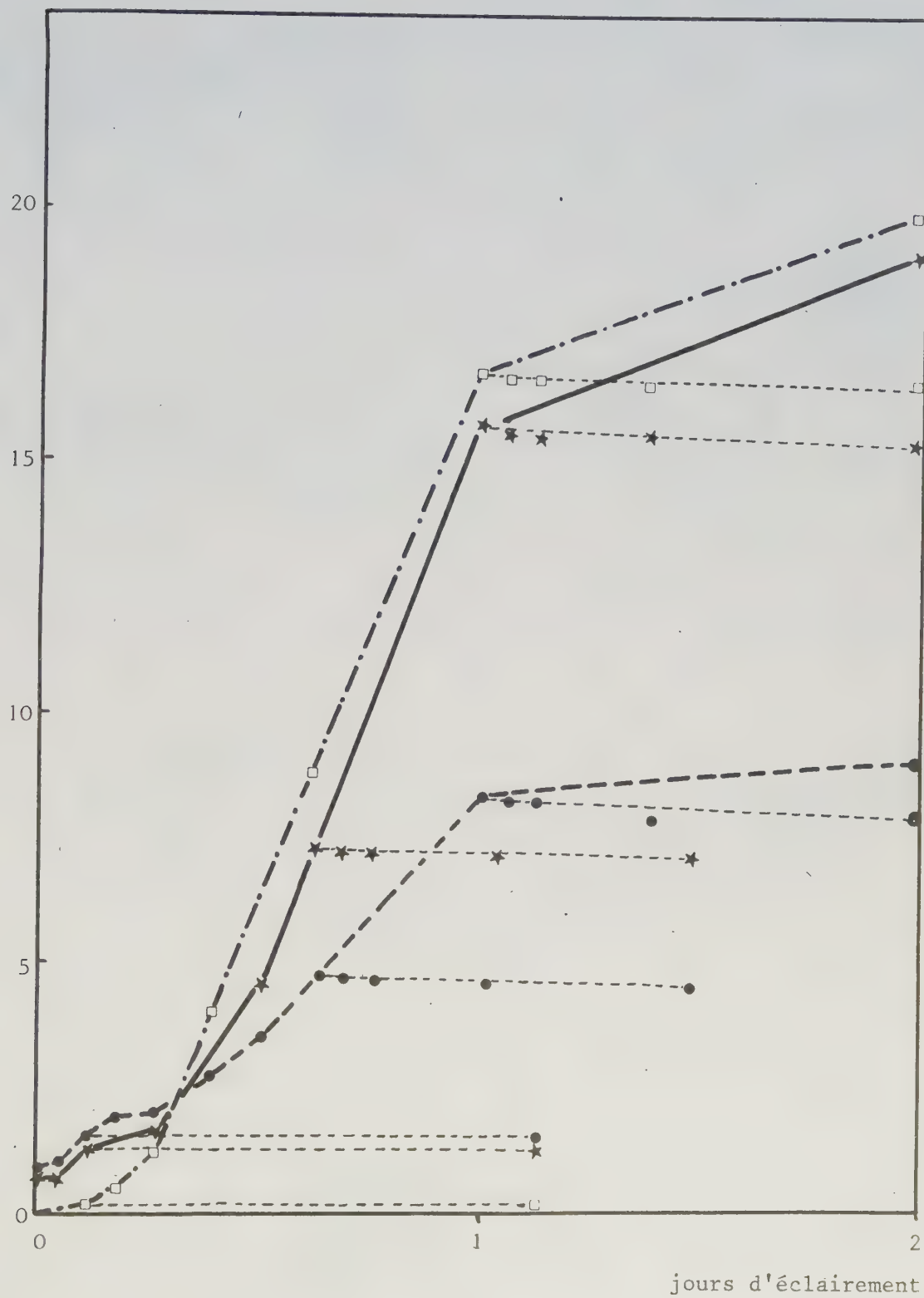


FIGURE 9 : Etapes du verdissement chez *Euglena gracilis*

- A : structure du proplaste chez une euglène étiolée
- B : 1/2 heure d'éclairement
- C : 1 heure d'éclairement
- D : 3 heures d'éclairement
- E : 3 heures d'éclairement
- F : 8 heures d'éclairement
- G : chloroplaste achevé

grandissement = 30 000

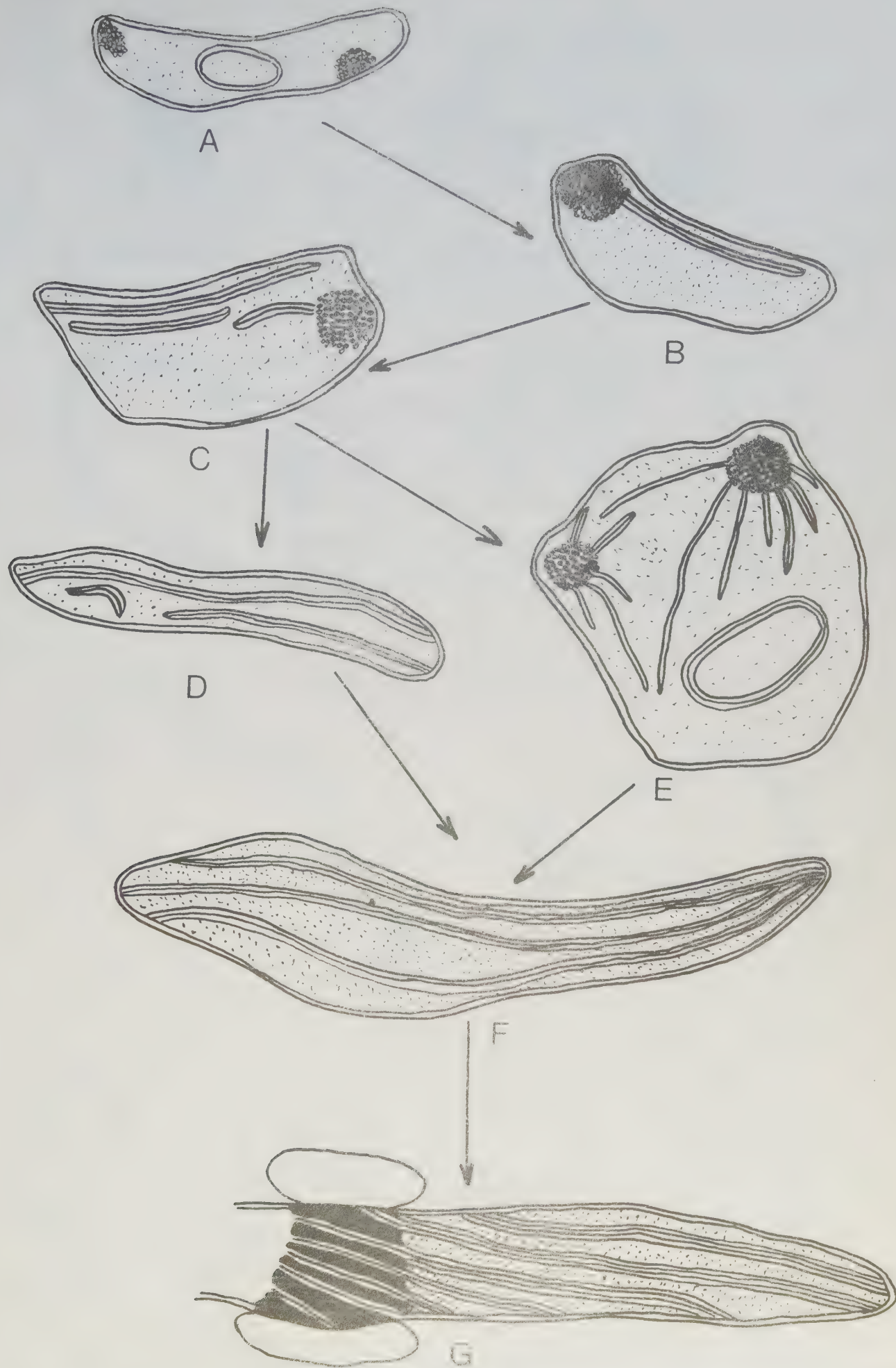


FIGURE 10 : Influence de l'éclairement sur la structure chloroplastique résiduelle de la souche d'euglène définitivement blanchie

AB : plastes de *α¹ Ly 1* cultivées à l'obscurité

CD : plastes après 1 heure d'éclairement

EF : plastes après 3 heures d'éclairement

G : plastes après 8 heures d'éclairement

HI : plastes après 30 heures d'éclairement

J : plastes de *α¹ Ly 1* cultivées à la lumière

grandissement = 30 000

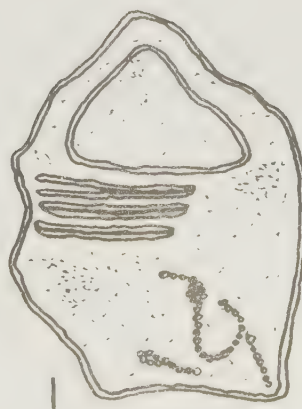
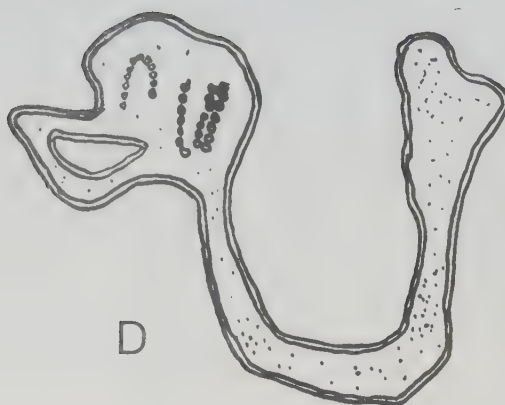
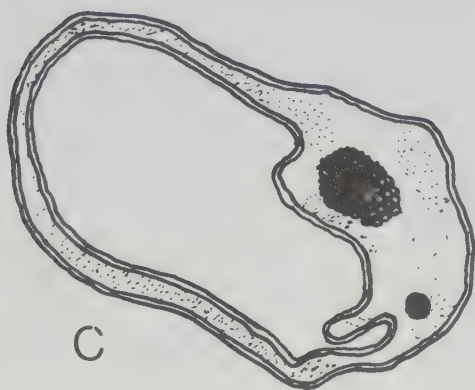
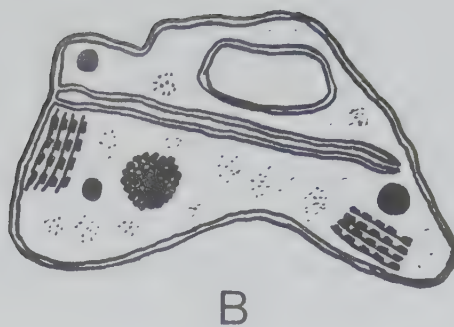
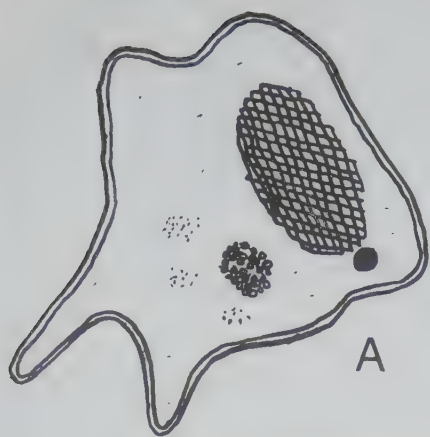


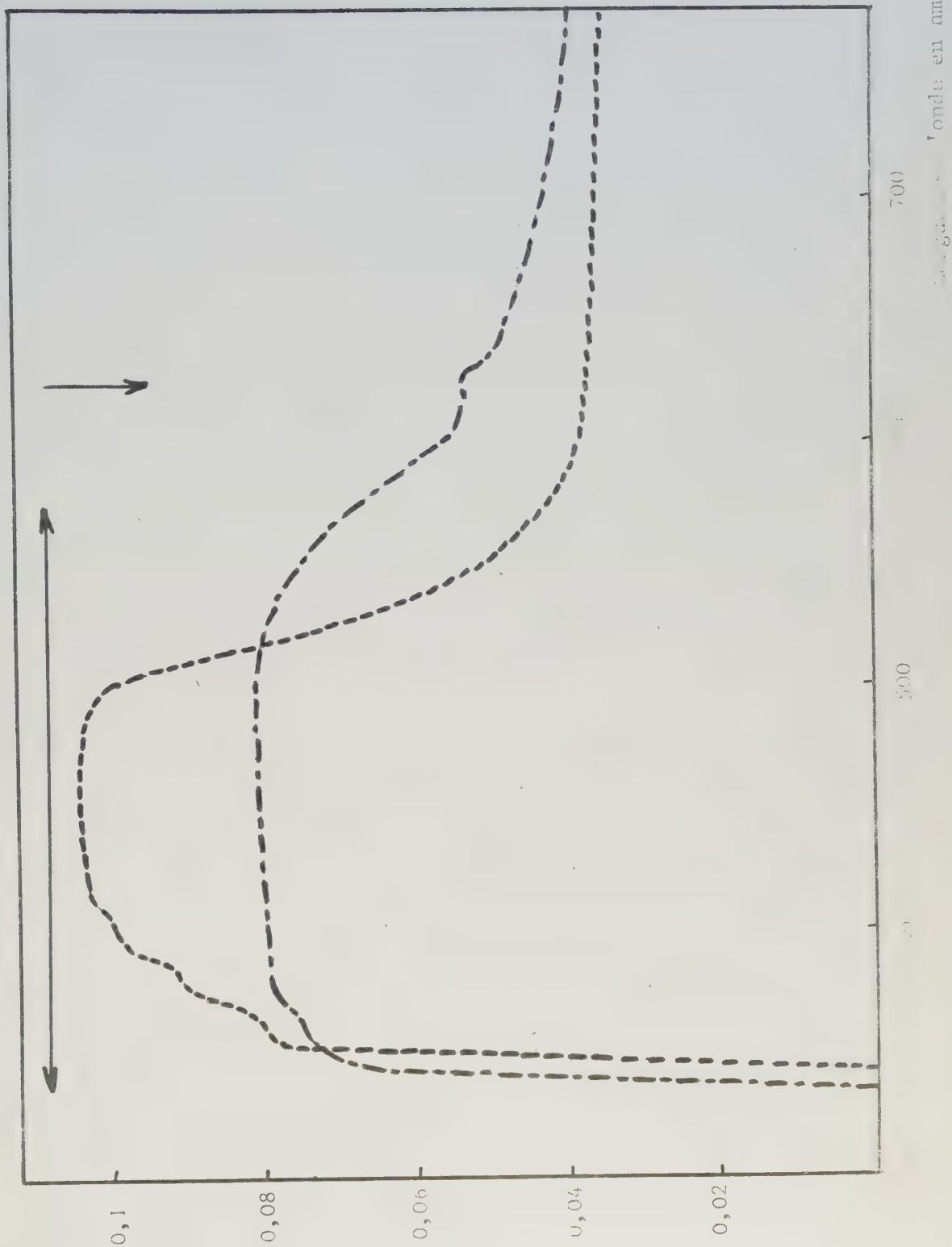
FIGURE 11 : Analyse spectrophotométrique des pigments chez les souches étio-
lée et *al Ly 1*. Absorption de l'extrait acétonique en D.O. pour
 5.10^6 cellules.

↔ zone d'absorption des caroténoïdes

↓ pic de protochlorophylle

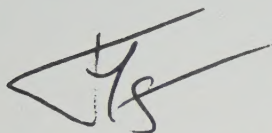
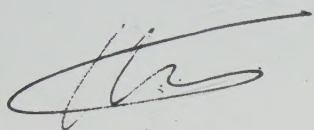
-·-·- spectre obtenu à partir de la souche étiolée

----- spectre obtenu à partir de la souche *al Ly 1*



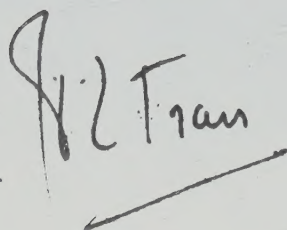
Vu :

Les Membres du Jury,

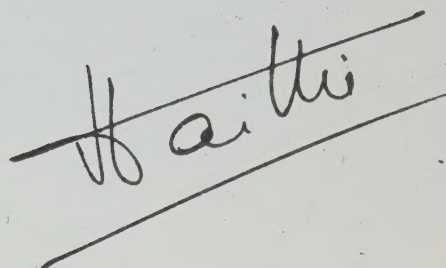


V. NIGON

F. STOEBER



M. LEFORT-TRAN



M. DAILLIE

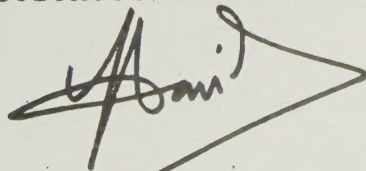
Vu et accordé le permis d'imprimer.

Lyon, le 16 mars 1971

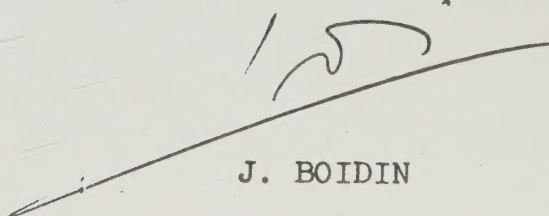
Le Président de l'Université
Claude Bernard,

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences de la Nature,



L. DAVID



J. BOIDIN

